Nucleosidcarbonsäuren als Modellnucleotide
Synthese und Verhalten in Enzymsystemen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

WILFRIED MEYER

aus Nürnberg

Marburg/Lahn 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

Nucleosidcarbonsäuren als Modellnucleotide
Synthese und Verhalten in Enzymsystemen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

WILFRIED MEYER
aus Nürnberg

Marburg/Lahn 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am: 26.4.1979

Tag der mündlichen Prüfung: 9.5.1979

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann
Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Schneider

Abkürzungen

CD	Circulardichroismus
DC	Dünnschichtchromatografie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
FD-MS	Felddesorptionsmassenspektrometrie
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2'-ethansulfonsäure
MES	2(N-Morpholino-)ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
nkat	Nanomole Umsatz von Substrat pro Sekunde
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMR	Protonenresonanzspektroskopie
PSC	Präparative Schichtchromatografie
SC	Säulenchromatografie
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UV	Ultraviolettspektroskopie

NMP, NDP, NTP dNMP, dNDP, dNTP	Die 5'-Mono-, Di- und Triphosphate der Nucleoside werden in der üblichen Weise abgekürzt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

		Seite
1.	Einleitung	
1.1.	Nucleosidcarbonsäuren als Modellnucleotide	3
1.2.	Biochemische Eigenschaften und Anwendungen	4
1.3.	Darstellungsmöglichkeiten und Reaktionen	9
1.4.	Zielsetzung dieser Arbeit	13
2.	Ergebnisse und Diskussion	
2.1.	Synthese und Eigenschaften von Nucleosid-carbonsäuren und deren Derivaten	15
2.1.1.	6'-Nucleosidcarbonsäurenitrile durch Kronenetherkatalyse	15
2.1.1.1.	6'-Adenosincarbonsäurenitril	15
2.1.1.2.	Pyrimidinnucleosidcarbonsäurenitrile aus Tosylaten	18
2.1.1.3.	6'-Nucleosidcarbonsäurenitrile aus O^2,5'-Cyclopyrimidinen	22
2.1.2.	Reaktionen der Nitrile	25
2.1.2.1.	6'-Nucleosidcarbonsäurenitrile in wässrig-lakalischer Lösung	25
2.1.2.2.	Selbstkondensation von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin	31
2.1.3.	Nucleosidcarbonsäureester und Nucleosid-carbonsäuren	38
2.1.4.	6-Modifizierte Purinriboside	40
2.1.5.	Spektroskopische Daten	42
2.1.5.1.	Strukturbeweise	42
2.1.5.2.	Circulardichroismus und Konformation	49
2.2.	5'-Homologe Adenosincarbonsäuren in Enzymsystemen	61
2.2.1.	N^6-Desaminierungsreaktionen	62
2.2.1.1.	Eigenschaften und physiologische Rolle von AMP-Desaminase	62
2.2.1.2.	Adenosincarbonsäuren als Substrate der AMP-Desaminase	66

2.2.1.3.	Vergleich mit Adenosindesaminase	75
2.2.2.	Adenosincarbonsäuren als Inhibitoren der Myokinase	75
2.2.3.	Adenosincarbonsäuren als Inhibitoren der 5'-Nucleotidase	81
3.	Experimenteller Teil	
3.1.	Nucleosidsynthesen	87
3.1.1.	Allgemeine Methoden	87
3.1.1.1.	Chromatografie	87
3.1.1.2.	Spektroskopie	89
3.1.2.	Darstellung einzelner Verbindungen	91
3.1.2.1.	Adenosinderivate (1-6)	93
3.1.2.2.	Inosin- und Chlorpurinribosid-derivate (7-12)	97
3.1.2.3.	Uridinderivate (13-16)	100
3.1.2.4.	Thymidinverbindungen (17-25)	102
3.1.3.	Selbstkondensation von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin	108
3.2.	Enzymkinetik	109
3.2.1.	Messungen der Reaktionsgeschwindigkeiten	109
3.2.1.1.	AMP-Desaminase (E.C.3.5.4.6)	109
3.2.1.2.	Adenosindesaminase (E.C.3.5.4.4)	110
3.2.1.3.	5'-Nucleotidase (E.C.3.1.3.5)	110
3.2.1.4.	Myokinase (ATP:AMP-Phosphotransferase, E.C.2.7.4.3)	111
3.2.2.	Diagramme	113
4.	Zusammenfassung	119
5.	Literatur	122

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0055

1. Einleitung

Nucleotide sind als Vorläufer der Nucleinsäuren und als Effektoren und Cofaktoren zahlreicher Schlüsselenzyme des Stoffwechsels für jeden Organismus von zentraler physiologischer Bedeutung. Die Enzymausstattung für Nucleotidsynthesen, Nucleotidumwandlungen und zur Darstellung der verschiedenen Phosphorylierungsstufen ist daher sehr aufwendig in Anzahl und Regulation der beteiligten Proteine. Dies trifft besonders auf alle Enzyme zu, die Nucleosid-5'-monophosphate bereitstellen oder umsetzen, denn die Vielfalt der für RNA- und DNA-Biosynthese benötigten Purin- und Pyrimidinnucleotide und ihrer Vorstufen wird fast ausschließlich auf der Monophosphatstufe produziert. Sowohl Purin- als auch Pyrimidin-de novo-Synthese haben das 5'-Nucleosidmonophosphat als Endprodukt: Startmolekül der Purinbiosynthese ist D-Ribose-5-phosphat, nach Anknüpfung einer β-ständigen Aminogruppe am C-1 und schrittweisen Aufbau des Purinrings resultiert 5'-IMP. Oxidation und Einführung einer Aminogruppe am C-2 führt zu GMP, Kondensation von IMP mit Asparaginsäure und Abspaltung von Fumarat ergibt AMP. Primärprodukt der Pyrimidin-de novo-Synthese ist Orotsäure; nach Reaktion mit 5-Phosphoribosylpyrophosphat und Decarboxylierung entsteht mit 5'-UMP aber ebenfalls ein 5'-Nucleosidmonophosphat. Die Synthese der Thymidinnucleotide nimmt gleichfalls den Weg über das Monophosphat, sodaß nach Reduktion von UDP zu dUDP zuerst Dephosphorylierung zu dUMP erfolgen muß, ehe dieses als Substrat der Thymidylatsynthetase akzeptiert wird; nach Thymidylatkinasereaktion sind höhere Phosphorylierungsstufen zugänglich. Nicht nur de novo-Synthese und Umwandlungen innerhalb der Purin- und Pyrimidinnucleotide laufen, mit Ausnahme von UTP → CTP, auf der Monophosphatstufe ab, sondern auch die bisher bekannten 'salvage pathway' - Reaktionen haben 5'-Nucleosidmonophosphate als Endprodukte, unabhängig davon, ob sie direkt aus Nucleobase und 5-Phosphoribosylpyrophosphat oder erst nach Phosphorylierung des Nuleosids (aus Base und Ribose-5-phosphat) entstehen. Die meisten 'seltenen' Basen in Nucleinsäuren entstehen zwar durch Modifizierung hochmolekularer DNA und RNA. Immerhin kennt man bei niederen Organismen aber auch in diesem Bereich Biosynthesen auf der Stufe der Mononucleotide, unter denen die Des-

oxycytidylat - Methyltransferase (dCMP→m^5dCMP) in phageninfiziertem Xanthomonas oryzae [1] und die N^6-Isopentenylierung von AMP (Cytokinin-Synthese) in Dictyostelium discoideum [2] genannt seien.

Unter den Nucleosidmonophosphaten fällt dem 5'-AMP als Vorstufe des universellen biochemischen Energieträgers 5'-ATP und als Effektor zahlreicher Schlüsselenzyme zusätzlich eine Sonderrolle zu. Das Verhalten der meisten Enzyme, die AMP als Substrat oder Modulator benötigen, erklärt sich aus dem Bestreben der Zelle, den physiologischen Wert der energy charge [3] (energy charge = $(0{,}5\ c_{ADP} + c_{ATP}) (c_{AMP} + c_{ADP} + c_{ATP})^{-1}$) von 0,9 aufrechtzuerhalten. Sinkt der Wert in extremen Stoffwechsellagen ab, kann zur Stabilisierung der AMP-Pool verkleinert werden. Dies geschieht durch Aktivierung der AMP-Desaminase (E.C. 3.5.4.6) [4] oder AMP-Nucleosidase (E.C. 3.2.2.4) [5], Enzymen ähnlicher Struktur, komplexer Regulation und mit 5'-AMP als einzigem Substrat [6-8]. 5'-Nucleotidase (E.C. 3.1.3.5) verringert zwar auch die AMP-Konzentration; die fehlende Basenspezifität macht aber eine eher allgemeine Rolle im Nucleotidstoffwechsel wahrscheinlich [9]. Durch die Myokinase (ATP:AMP-Phosphotransferase, E.C.2.7.4.3) ist der direkte Zusammenhang zwischen AMP, ADP und ATP gegeben. Indirekt wirkt AMP als Modulator von AMP-liefernden bzw. verbrauchenden Stoffwechselwegen: Phosphofructokinase (Fructose-6-phosphatkinase, E.C. 2.7.1.11), das Schlüsselenzym der Glykolyse, wird durch AMP stimuliert [10], cytoplasmatische Fructosebisphophatase (E.C. 3.1.3.11), allosterisches Enzym der Gluconeogenese, durch AMP gehemmt.

Nucleosidmonophosphat-umsetzende Enzyme sind wegen ihrer hohen, oft ausschließlichen Spezifität für ein einziges Nucleotid vergleichsweise gut überschaubare und attraktive Systeme, um die zwischen Nucleotiden und Nucleotidbindungsstellen in Enzymen wichtigen Wechselwirkungen zu studieren. Bisherige Kenntnisse hierüber sind allerdings erstaunlich lückenhaft. Durch Einsatz von Modellverbindungen gezielt variierter Struktur sind hier noch viele weitergehende Aussagen zu erwarten.

1.1. Nucleosidcarbonsäuren als Modellnucleotide

In der Reihe der basenmodifizierten Nucleoside sind Modellverbindungen seit langem in großer Zahl bekannt; ihr Wert für Enzym - Substratbindungsstudien bleibt wegen der sehr engen Toleranz nucleosidmonophosphatumsetzender Enzyme für Strukturabweichungen in der Base jedoch meist auf Spezialfälle beschränkt. Modellverbindungen des zuckermodifizierten Typs finden dagegen zunehmend Beachtung, weil der Fundus natürlich vorkommender Verbindungen durch Entwicklung neuartiger Synthesemethoden ständig ergänzt wird. Vor allem 5'-modifizierte Nucleoside sind wünschenswert, die statt eines Phosphatrests andere geladene Gruppen, polare oder unpolare Substituenten tragen, um über die Bedeutung der negativen Ladung der Phosphatgruppen an Nucleotiden für Substrat- oder Effektoreigenschaft Informationen zu erhalten. Sind innerhalb einer solchen Substanzklasse außerdem weitere Abstufungen möglich, wie zum Beispiel in der Länge der exocyclischen 5'-C-Kette, so können nicht nur die unter physiologischen Bedingungen maßgebenden relativen Anordnungen von Base zu Ribo- oder Desoxyribofuranosering (Konformation), sondern auch deren relative Abstände zu einer exocyclischen Gruppe in ihren Auswirkungen untersucht werden. Eine Substanzklasse, die solchen Ansprüchen genügt, ist die der Nucleosidcarbonsäuren (Abb. 1):

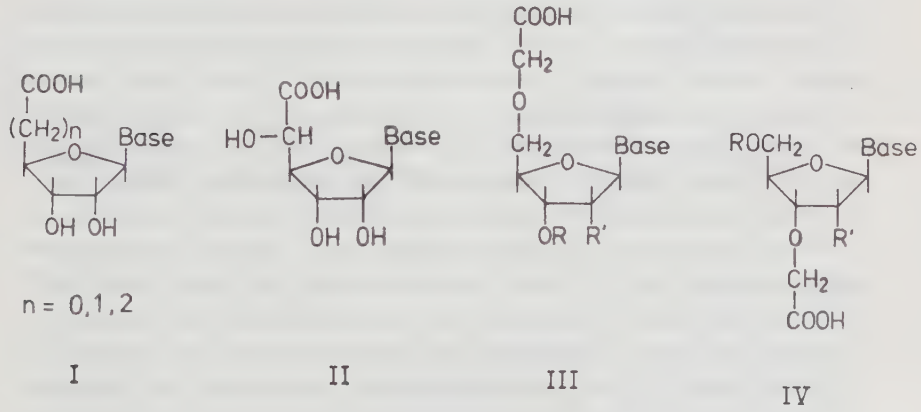


Abb. 1 : Nucleosidcarbonsäuren

Die bisher bekannten Modellnucleotide dieses Typs lassen sich je nach Position des eingeführten Carbonsäurerests in die Gruppen der homologen 5'-Desoxynucleosidcarbonsäuren (I) einschließlich der Nucleosiduronsäuren (n = 0), der 5'-C-Carboxynucleoside (II), der 5'-Carboxymethylnucleosid- (III) und der 3'-Carboxymethylnucleosidcarbonsäuren (IV) einteilen. Nucleosiduronsäuren (I, n = 0), 5'-Desoxy-β-D-ribo- (-desoxyribo-) -hexofurannucleosiduronsäure (I, n = 1) und 5',6'-Didesoxy-β-D-heptofurannucleosiduronsäure (5'-Desoxy-5'-nucleosidessigsäure, I, n = 2) werden im Folgenden der Anschaulichkeit halber als 5'-6'- bzw. 7'-Nucleosidcarbonsäuren bezeichnet.

1.2. Biochemische Eigenschaften und Anwendungen

Nucleosidcarbonsäuren liegen in neutralen, wässrigen Lösungen als Monoanionen vor und ähneln in ihrer Konformation und in der Position des anionischen 5'-Substituenten den 5'-Nucleosidmonophosphaten, die sie in verschiedenen Enzymsystemen vertreten können. Neben dieser Verwendung als Substrate oder Effektoren lassen sich Nucleosidcarbonsäuren oder deren Derivate in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid zu Oligomeren kondensieren. Gegenüber den Oligonucleotiden natürlichen Ursprungs unterscheiden sich die Oligonucleotidanalogen durch ein neutrales Esterrückgrat und können als Modellverbindungen zu Hybridisierungsexperimenten und zur Analyse der Base-Base-Wechselwirkung herangezogen werden. Vorzugsweise eignen sich die 3'-O-Carboxymethylderivate von 2'-Desoxyadenosin, -Guanosin und -Cytosin [11] zur Kondensation, weil die richtige 3',5'-Verknüpfung bereits vorgegeben ist. Über 3'-O-Carboxymethyl-2'-desoxyadenosin (dAcm) ist das Poly(dA)-Analoge Poly(dAcm) zugänglich [12], das Acetatesterbindungen statt der Phosphodiesterbindungen enthält. Das Modellnucleotid zeigt bei 260 nm eine Hypochromie von 14 % gegenüber seinen monomeren Bestandteilen und hybridisiert mit Polyuridylsäure zu einem 1:1-Komplex (Hypochromie 21 %), der von Ribonuclease rasch abgebaut wird. Poly(dAcm) inhibiert die Anlagerung von Phe-$tRNA^{Phe}$ an Ribosomen in Gegenwart von Polyuridylsäure und es hemmt die Biosynthese von Polyphenylalanin in

zellfreien E.coli-Systemen mit Poly(U) als Messenger [12]. Auch weitere Befunde - Poly(dAcm) hybridisiert nicht mit Poly(A), sondern mit dem komplementären synthetischen Analogen Poly(Tcm) - zeigen, daß synthetische Polymere natürlichen Oligonucleotiden in ihren biochemischen Eigenschaften sehr nahe kommen [13]. Nucleosidcarbonsäuren des Typs III [14] kommen für die Synthese von Oligoribonucleotidanalogen weniger in Betracht, weil unter Kondensationsbedingungen die Internucleosidbindung nicht einheitlich 3',5' geknüpft wird. Das einzige, von 5'-O-Carboxymethyluridin abgeleitete, nucleosiddiphosphatanaloge 3'-O-(Uridin-5'-O-ylacetyl)-thymidin führt mit Polyadenyl- und Polyuridylsäure ebenfalls zu Hypochromieeffekten [14]. Da Oligoribonucleotide die Proteinbiosynthese unmittelbarer beeinflussen, wären dafür Modellverbindungen dieser Reihe von größerem Interesse, als die oben beschriebenen Oligodesoxyribonucleotidanalogen. Aus dem oben erwähnten Gründen gehen Syntheseversuche von oligomeren Modellverbindungen der Ribosereihe ebenfalls vom 3'-O-Carboxymethylnucleosiden aus. Ein aus 3'-O-Carboxymethyluridin und Uridin (jeweils mit geeigneten Schutzgruppen versehen) erhaltenes Dinucleotidanaloges ist zu hydrolyselabil, als daß es für biochemische Anwendungen in Frage käme [15].

Im Gegensatz zu den Nucleosidcarbonsäuren der Carboxymethylreihe, deren 4'-Seitenkette, verglichen mit den entsprechenden 5'-Nucleosidmonophosphaten, um eine Bindung zu lang ist, entspricht die 7'-Adenosincarbonsäure (Abb. 1, I, n = 2) sterisch weitgehend dem 5'-AMP. Außerdem ist auch die 5',6'-Didehydroverbindung bekannt [16]; beides sind hydrolysebeständige Modellnucleotide, die AMP als Bauelement in Oligonucleotiden und als Enzymsubstrate ersetzen können [17]. Wird unter Bedingungen der Dinucleosiddiphosphatsynthese 7'-Adenosincarbonsäure mit sich selbst oder einer äquivalenten Menge des Ethylesters kondensiert, erhält man die dem Dinucleosidphosphat ApA und dem Dinucleotid pApA vergleichbaren Dimeren als 2'/3'-Isomerengemische neben einer geringen Menge des trimeren Diesters. Ein einheitlich verknüpfter Ester entsteht durch Kondensation mit 5'-O-Acetyl-2'-desoxyadenosin. Die starke Hypochromie und der intensive Cotton-effekt im langwelligen Teil des CD-Spektrums der di- und trimeren 7'-Adenosincarbonsäure stimmt mit den entsprechenden

Werten für ApA und ApApA überein. Demnach hängt das Ausmaß der Basenstapelung hier nicht von der Struktur oder Ladung der verbindenden Glieder, sondern nur vom passenden Abstand der Chromophore ab. Höhere Polymere der 7'-Adenosincarbonsäure sollten wesentlich bessere Modelle für Poly(A) sein als das oben beschriebene Poly(dAcm). Allerdings ist die gezielte Knüpfung der 3'-5'-Internucleosidbindung, mangels geeigneter regioselektiver Methoden, ein noch ungelöstes Problem. Hinzu kommt, daß mit steigender Anzahl verknüpfter Nucleoside die Löslichkeit abnimmt. Dadurch sind die präparativen Möglichkeiten ebenso erschwert, wie die Verwendung der Oligonucleotidanalogen in Enzymtests. Die Brauchbarkeit der monomeren 7'-Adenosincarbonsäure als Enzymsubstrat, stellvertretend für AMP, ist bereits am Beispiel der AMP-Aminohydrolase aus Kaninchenmuskel belegt [18]. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß weitere nucleotidumsetzende Enzyme (Kinasen, Nucleotidasen) dieses Modellnucleotid anstelle des Substrats binden und deshalb gehemmt werden.

Die 5'-Nucleosiduronsäuren (I, n = 0) sind den natürlichen 5'-Nucleosidmonophosphaten weniger ähnlich als 7'-Nucleosidcarbonsäuren; die anionische Funktion der Uronsäure sitzt direkt am C-4' des Furanoserings und damit in einer Position, die sich sterisch deutlich von der der Phosphatgruppe in 5'-Nucleosidmonophosphaten unterscheidet. Pharmakologische Befunde (s. unten) geben Hinweise, daß auch Modellverbindungen dieses Typs Nucleotide in enzymatischen Reaktionen vertreten können. Die Uronsäuren sind gut verfügbar [19, 20] und werden auch zur Synthese modifizierter Nucleoside und Nucleotide herangezogen. Das gemischte Anhydrid aus 5'-Adenosincarbonsäure und Phosphorsäure [21] bietet sich zum Studium AMP-abhängiger Enzyme an. Aus Röntgenstrukturuntersuchungen [22] ist die exakte Konformation der 5'-Thymidincarbonsäure bekannt - allerdings in kristallinem Zustand und als freie Säure - die als Inhibitor der Thymidin- und Thymidylatkinase [23] ein wirksames Modellnucleotid ist. Die freie, anionische Form der 5'-Carboxylgruppe täuscht im Fall der Thymidinkinase das Produkt, im Fall der Thymidylatkinase das Substrat vor. Dafür wird ein Zusammenwirken von negativer Ladung und, im Vergleich zum unmodi-

fizierten Nucleosid, abweichender Konformation bezüglich der C-4'-C-5'-Bindung verantwortlich gemacht [22]. Die biologische Relevanz der im Kristall gefundenen Wasserstoffbrücken zwischen der Carboxylgruppe und den Atomen O-4 und N-3 zweier benachbarter Nucleosidmoleküle ist noch ungewiß; eine so geartete Wechselwirkung in Lösung zwischen Nucleobasen und (Amino-) Säuren wird für möglich gehalten.

Der bisher fehlenden 6'-Nucleosidcarbonsäure (I, n = 1) entspricht nach der Länge der 5'-C-Kette das 5'-C-Carboxyadenosin (II); die erschwerte Synthese aus dem 5'-C-Carboxamid [24] deckt sich mit unseren Erfahrungen bei Verseifungsexperimenten von 6'-Adenosincarbonsäureamid (Vgl. 2.1.2.1.). Beispiele biochemischer Verwendungen fehlen bisher; 5'-Monophosphate des 5'-C-Carboxamidadenosins zeigen mit AMP-Desaminase und 5'-Nucleotidase keine meßbare Aktivität [25].

Neben der Brauchbarkeit modifizierter Nucleoside für biochemische und biophysikalische Experimente darf man ihre potentielle pharmakologische Wirkung nicht außer acht lassen. Verabreicht man den in der Base am C-8 mit ^{14}C markierten 5'-Adenosincarbonsäureethylester Maus oder Hund, so beobachtet man Einbau von Radioaktivität in die Nucleinsäuren. Aufgetrennte Hydrolysate von DNA und RNA beweisen, daß ausschließlich Purine markiert sind [26]. Da die direkte enzymatische Funktionalisierung des Ethylesters zum 'natürlichen' dATP bzw. ATP äußerst unwahrscheinlich ist, dürfte die Nucleobase erst durch Nucleosidasereaktion vom Riboserest abgespalten werden, ehe sie über den salvage pathway in die DNA und RNA eingebaut wird. Offenbar erfüllt dieses Nucleosidcarbonsäurederivat die strukturellen Anforderungen verschiedener Enzyme des Nucleosid- und Nucleotidstoffwechsels.

Durch Verwendung der 5'-Adenosincarbonsäure und deren Ester und substituierten Amide als Modellsubstanzen gelingt es, die seit langem bekannten cardiovasculären Effekte des Adenosins und der Adenosinnucleotide genauer zu untersuchen, deren hohe Metabolisierungsraten eine direkte Analyse ausschließen.

Intravenöse Gaben eines Nucleosidcarbonsäurederivats bringen beim anästhetisierten Hund erhöhten Blutdurchfluß (Gefäßdilatation) und Sauerstoffgehalt (PO_2) in den Coronargefäßen, außerdem Absenkung des Blutdruckes bei gesteigerter Herzfrequenz. Die längste Wirkungsdauer mit den besten Dosis/Wirkungsverhältnissen beobachtet man jeweils mit Ethylester und Ethylamid [27, 28], die keine Substrate der Adenosindesaminase sind. 5'-Adenosincarbonsäureethylamid ist ebenfalls der wirkungsvollste Inhibitor der Adenosinaufnahme durch menschliche Erythrocyten [29]. Die coronardilatatorische Wirkung der 5'-Nucleosidcarbonsäurederivate läßt sich jedoch nicht auf eine Hemmung des Adenosintransports in die Erythrocyten zurückführen, weil die K_i-Werte weit über den Konzentrationen liegen, die bereits eine Gefäßerweiterung bewirken. Daraus werden für zelluläre Adenosinaufnahme und für Entspannung der glatten Muskulatur in den sterischen Anforderungen unterschiedliche Rezeptoren abgeleitet [29].

Hier, wie bei anderen Enzymreaktionen und Transportprozessen ist eine Palette von homologen 5'-C-kettenverlängerten Nucleosidcarbonsäuren (einschließlich Derivaten) wünschenswert, mit deren Hilfe Substrat- oder Inhibitoreigenschaften mit dem Abstand des Monoanions (bzw. einer Cyano-, Amid- oder Esterfunktion) vom Zuckerrest in Beziehung gebracht werden kann. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals neben präparativen Wegen zu 6'-Nucleosidcarbonsäuren und deren Nitrilen, Estern und Amiden auch biochemische Anwendungen.

1.3. Darstellungsmöglichkeiten und Reaktionen

Zur Darstellung der kurzkettigen 5'-Nucleosidcarbonsäuren (Uronsäure) wird die seit langem bekannte katalytische Oxidation primärer Hydroxylgruppen von Polyolen angewandt [20]. Die Uronsäuren der Pyrimidinnucleoside Thymidin und Uridin sind dadurch leicht verfügbar; Adenosin-5'-carbonsäure als Vertreter der Purinreihe erhält man jedoch besser durch Oxidation von 2',3'-Isopropylidenadenosin in alkalischem Kaliumpermanganat [19], Inosin-5'-carbonsäure aus 2',3'-Isopropylideninosin durch Behandeln mit Chrom(VI)oxid in Eisessig [30]. 5'-Nucleosidcarbonsäuren sind als Ausgangsverbindungen verschiedener Synthesen von Interesse. So lassen sich die nach gängigen Methoden erhaltenen Ester [31] in einigen Fällen via Amide in die entsprechenden Nucleosidcarbonsäurenitrile gleicher C-Atomzahl umwandeln [34]. Die gemischten Anhydride aus Uronsäure und Phosphorsäure haben als modifizierte, den 5'-Nucleotiden isostere Verbindungen für Enzym-Substratbindungsstudien Interesse [21]. 5'-C-kettenverlängerte Nucleoside sind mangels geeigneter C-C-verknüpfender Reaktionen nur in Einzelexemplaren bekannt. Eine Gruppe von Adenosinderivaten leitet sich von dem seit 1965 verfügbaren 'Adenosin-5'-aldehyd' ab, der sich allerdings nicht als Reinsubstanz gewinnen läßt [32]. Der durch sehr milde Oxidation mit DMSO in Gegenwart von DCC (Pfitzner-Moffatt-Oxidation) aus 2',3'-Isopropylidenadenosin entstehende Aldehyd kann mit Nitromethan [16], Grignardreagenzien und Acetoncyanhydrin [25] umgesetzt werden. Die Wittigreaktion mit dem stabilen Ethoxycarbonylmethylentriphenylphosphoran verläuft glatt und eröffnet den Zugang zu 5'-Desoxy-5'-adenosinessigsäure [16], die nach Hydrierung des Wittigprodukts und anschließender Verseifung erhalten wird (Abb. 2, Reaktionsfolge A). Um das Syntheseziel 6'-Adenosincarbonsäure, die AMP-analoge Modellverbindung mit bisher fehlender 5'-C-Kettenlänge, zu erreichen, muß ein C-Atom am 5'-Ende des Adenosins eingeführt werden. Dafür kann eine Wittigreaktion des Adenosin-5'-aldehyds mit Methoxymethylentriphenylphosphoran zum Enolether erwogen werden, dessen saure Hydrolyse zum 'Adenosin-6'-aldehyd' problemlos sein sollte. Nach den Er-

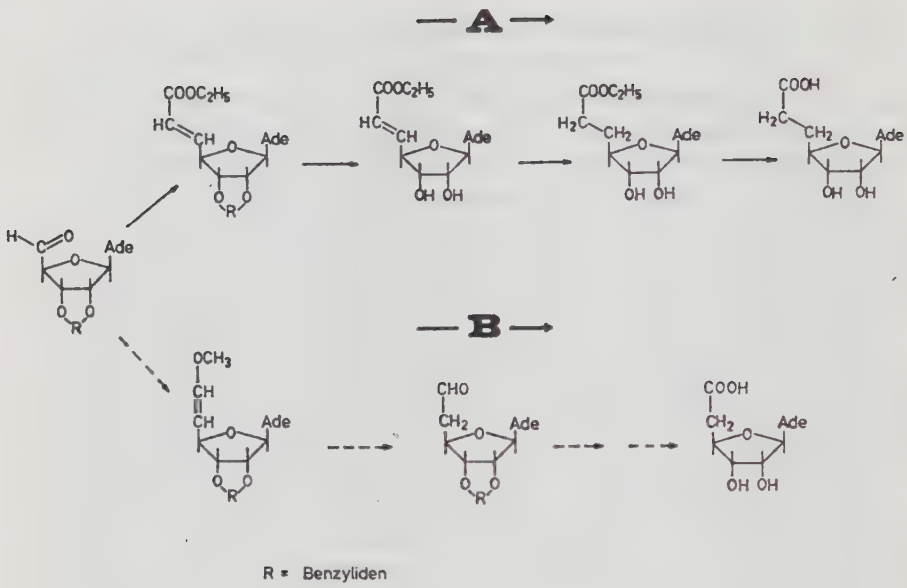


Abb. 2

fahrungen mit dem Adenosin-5'-aldehyd muß für den homologen Aldehyd mit ebenso diffiziler Reinigung und extremer Schwerlöslichkeit gerechnet werden, sodaß eine schonende Oxidationsmethode leichter zu finden sein dürfte, als ein geeignetes Lösungsmittel (Abb. 2, Reaktionsfolge B). Bisher gelingt es jedoch nicht, aus Nucleosidaldehyd und dem wenig reaktiven α-Methoximethylentriphenylphosphoran das Wittigprodukt zu erhalten [33].

Alternativ bietet sich ein Syntheseweg an, dessen erster Schritt eine Kolbe-Nitrilsynthese am 5'-C-Atom vorsieht. Zwar sind, ausgehend von den einfach zugänglichen Nucleosid-5'-tosylaten eine Anzahl 5'-substituierter Nucleoside bekannt, die durch S_N-Reaktionen mit zahlreichen, Heteroatome enthaltenden Nucleophilen (P, N, S, O, Halogen) dargestellt werden [34,35]. Es fehlen jedoch Beispiele 5'-C-C-verlängerter Nucleoside, wie sie durch Umsetzung der Tosylate mit Cyanid oder metallorganischen Verbindungen denkbar wären. Danach erscheinen

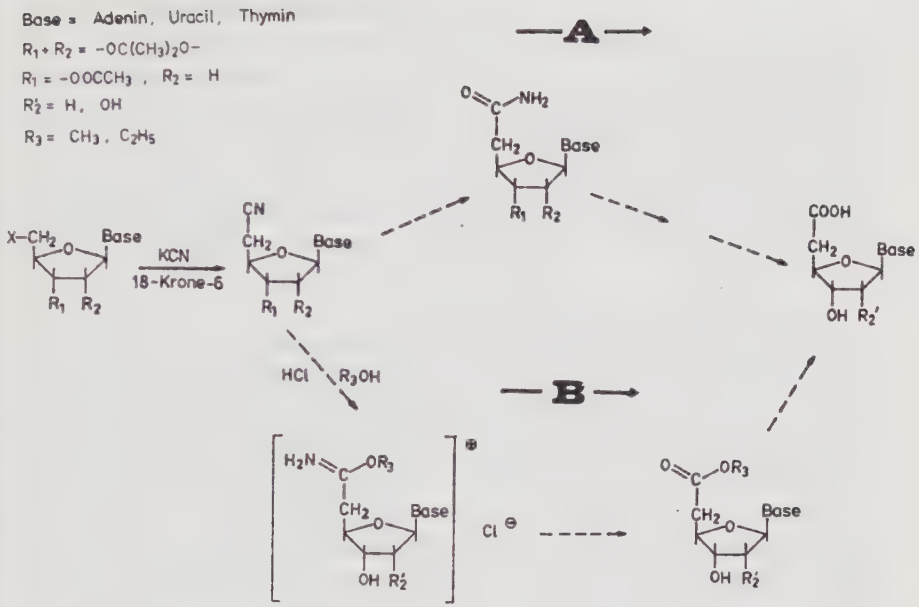


Abb. 3

die weniger leicht zugänglichen 5'-Halogenide [35-37] als aussichtsreichste Ausgangsverbindungen für solche Reaktionen, zumal in einem Einzelfall die Nitrilsynthese nach herkömmlichem Muster gelingt [38]. Alle anderen Darstellungsversuche unter Standardbedingungen bleiben jedoch wegen der komplexen Produktzusammensetzung mit sehr geringem Nitrilanteil präparativ unbefriedigend [33].

Dagegen können wir im heterogenen System fest/flüssig einer mit Kronenether phasentransferkatalysierten Reaktion aus 5'-Tosyl-2',3'-isopropylidenadenosin 5'-Desoxy-5'-cyanoadenosin [39] in guten Ausbeuten darstellen (Abb. 3). 5'-Tosyl-2',3'-isopropylidenuridin reagiert unter diesen Bedingungen in geringem Ausmaß zum gewünschten Nitril; Hauptprodukt ist das O^2,5'-verbrückte Cyclonucleosid, dessen bisherige, umständliche Synthese [40] damit wesentlich vereinfacht werden kann. O^2,5'-Cyclonucleoside beanspruchen nicht nur per se als konformations-

fixierte Modellverbindungen Interesse, sondern auch als reaktive Ausgangsverbindungen zur Synthese basenmodifizierter Pyrimidinnucleoside [41]. Gemeinsam ist den beschriebenen Reaktionen das Verhalten des Riboserests als nucleofuge Gruppe, die von Alkoholen, Schwefelwasserstoff , Ammoniak und Aminen durch Angriff am Pyrimidin-C-2 unter Erhaltung der N-Glykosidbindung verdrängt wird. Möglicherweise läßt sich durch kronenetheraktiviertes Cyanid umgekehrt die Base als interne nucleofuge Gruppe zur Darstellung von 5'-Desoxy-5'-cyanopyrimidinen nutzen.

Die Darstellung der 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrile erscheint gegenwärtig als kritischste Stufe des Synthesekonzepts, während die Hydrolyse der Nitrile via Amide zu den 6'-Nucleosidcarbonsäuren realisierbar sein sollte, zumal die schonende Verseifung des 6'-Adenosincarbonsäurenitrils in alkalischer Lösung zum Amid bereits gelingt [18] (Abb. 3, Reaktionsfolge A). Hydrolyseversuche in wässrigen Säuren sind wegen der Säurelabilität der N-glykosidischen Bindung [42, 43] sicherlich chancenlos. Aus gleichem Grund muß man den alternativen Weg Iminoesterhydrchlorid - Ester - Carbonsäure (Abb. 3, Reaktionsfolge B) skeptisch beurteilen. Die bei Adenosin und Uridin erfolgreiche Nitrilsynthese sollte allgemein anwendbar sein, sodaß, ungeachtet der bei der Verseifung eventuell auftretenden Probleme, Nucleosidcarbonsäurenitrile die Ausgangsverbindungen der Wahl bleiben. Einer auf Nucleosid-5'-aldehyden aufbauenden Darstellung muß diese Vielseitigkeit fehlen, weil bisher erst Adenosin- und Uridin-5'-aldehyd verfügbar sind und außerdem deren 5'-C-Verlängerung um ein C-Atom gegenwärtig nicht möglich erscheint [44].

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Gegenwärtig gibt es keine Alternative zu Enzymstudien mit Modellverbindungen, wenn ein besseres Verständnis der zwischen Nucleotiden und Enzymen ablaufenden Erkennungsprozesse erreicht werden soll. Vorrangiges Ziel dieser Arbeit ist es daher, durch Synthese der bisher fehlenden 6'-Adenosincarbonsäure die Reihe der 5'-AMP-analogen Modellnucleotide zu vervollständigen.

Mit 5'-Desoxy-5'-cyanoadenosin steht ein geeignetes Ausgangsmolekül zur Verfügung, dessen Synthese durch nucleophile Substitution mit kronenetheraktiviertem Cyanid als Agens noch optimiert werden kann. Einen Hinweis auf eine breitere Anwendungsmöglichkeit der Darstellungsmethode auch auf Pyrimidinnucleoside haben wir bereits [18], ein überzeugendes Beispiel jedoch fehlt. Als Ausgangsmaterialien für die Synthese von Pyrimidincarbonsäurenitrilen ziehen wir im Verlauf der Arbeit auch O^2,5'-Cyclonucleoside in Betracht, die bei der Umsetzung von 5'-Tosylaten im System 18-Krone-6 / KCN überwiegend anfallen.

Zur zunächst favorisierten Verseifung der Nitrile via Amide zu den gewünschten 6'-Nucleosidcarbonsäuren in alkalischer Lösung werden systematische Vesuche unternommen, die ein unerwartetes Verhalten der Nitrile belegen, aber nicht zum Ziel führen. Die schließlich erfolgreiche Synthese gelingt in saurer Lösung und führt über den Ester.

Sämtliche während der präparativen Arbeiten neu erhaltenen Nucleoside sind mit spektroskopischen Methoden zu charakterisieren. Besonders einzugehen ist bei 5'-modifizierten Nucleosiden auf den Zusammenhang zwischen Struktur und Konformation, der sich durch vergleichende Interpretation von PMR- und CD-spektren ergibt; dafür stehen uns zahlreiche Vergleichssubstanzen und -Spektren zur Verfügung.

Im zweiten Hauptteil der Arbeit soll der komplette Satz Adenosincarbonsäuren zu Enzymstudien mit einigen oben bereits erwähnten AMP-abhängigen Enzymen herangezogen werden. Wo Adenosincarbonsäuren als Substrate akzeptiert und auch umgesetzt werden (AMP-Desaminase), sind kinetische Parameter bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit von Struktur, Konformation und Position der negativen Ladung zu diskutieren.

Myokinase und 5'-Nucleotidase werden Adenosincarbonsäuren zwar nicht umsetzen, da man sonst die Bildung eines gemischten Anhydrids bzw. Spaltung einer C-C-Bindung voraussetzen müßte; dagegen ist je nach Art und Anzahl der Bindungsstellen am Enzym mit abgestufter Inhibierung, auch unterschiedlichen Typs zu rechnen.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1. Synthese und Eigenschaften von Nucleosidcarbonsäuren und deren Derivaten

2.1.1. Nucleosidcarbonsäurenitrile durch Kronenetherkatalyse

Die vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten einer Cyanofunktion machen 5'-Desoxy-5'-cyanonucleoside zu einer hochinteressanten Klasse von Modellverbindungen. Neben dem organisch präparativen Aspekt gestatten sie es, einige Konzepte der Nucleosidchemie und -Biochemie zu überprüfen und auf eine breitere Grundlage zu stellen. So wird postuliert, daß die Wechselwirkung polarer 5'-Substituenten mit der Nucleobase eine bevorzugte Molekülkonformation der Nucleoside stabilisiert [45]; in diesem Zusammenhang sind Nucleosidcarbonsäurenitrile lange gesuchte Derivate. Die in Einzelfällen beobachtete und auf C-H-Acidität zurückgeführte Nucleosidspaltung in wässrigem Alkali [46] kann mit ihnen genauer untersucht werden, da Nitrile des nachfolgend beschriebenen Typs eine Methylengruppe α-ständig zur Cyanofunktion aufweisen; im Laufe dieser Arbeit können allerdings nur Reaktionsmöglichkeiten diskutiert werden, soweit sie Syntheseschritte zum Zielmolekül 6'-Nucleosidcarbonsäure betreffen. Eine Verbesserung und Erweiterung des Nitrilsynthesekonzepts mit Kronenether / KCN ist aus allen diesen Gründen unbedingt erwünscht.

2.1.1.1. 6'-Adenosincarbonsäurenitril

Länger bekannte Darstellungsversuche von 5'-Desoxy-5'-cyanonucleosiden folgen dem herkömmlichen Muster einer Kolbe-Nitrilsynthese und gehen von 5'-Halogeniden oder 5'-Tosylaten aus [33,38]. Auch beim Einsatz von 2',3'-(in Ribosiden)- bzw. 3'-(in Desoxyribosiden) geschützten Nucleosiden mit gesteigerter Löslichkeit in schwächer polaren Lösungsmitteln gibt es, soll die

S_N-Reaktion in homogener Phase durchgeführt werden, keine Alternative zu polaren Lösungsmitteln wie DMSO, denn nur so ist eine genügend hohe Konzentration von KCN und Ausgangsnucleosid gewährleistet. Die unangenehmen Begleiterscheinungen von DMSO (Schwerflüchtigkeit und Neigung zu Folgereaktionen) machen Ansätze mit geringer, IR-spektroskopisch gerade nachweisbarer Nitrilbildung jedoch präparativ in jeder Hinsicht uninteressant. Der Durchbruch gelingt erst im heterogenen System fest / flüssig einer Phasentransferkatalyse mit Kronenether, einem Synthesekonzept, das in der präparativen Organik mittlerweile einen festen Platz einnimmt [47-52]. Setzt man 5'-Tosyl-2',3'-isopropylidenadenosin in Dioxan oder Acetonitril mit KCN in Gegenwart von 18-Krone-6 um, so entsteht als einziges Produkt 5'-Desoxy-2',3'-isopropylidenadenosin; die Ausbeuten schwanken um 50 % (Abb. 4). Basische Spaltung der N-Glykosidbindung, wie sie in wasserfreiem Medium zum Zuge kommt [53], unterbleibt völlig; im Gegensatz dazu wird bei Umsetzungen von 2',3'-geschütztem und ungeschütztem 5'-Desoxy-5'-iod- und 5'-Tosyladenosin im System DMF / KCN / 18-Krone-6 Nucleosidspaltung zur Hauptreaktion [18]. Da einerseits Dioxan als auch Acetonitril unter diesen Reaktionsbedingungen indifferent und leicht wieder zu entfernen ist, andererseits gebildetes Kaliumtosylat überwiegend ausfällt und noch gelöste Salze durch Kieselgelfiltration entfernt werden können, ist die Aufarbeitung der Reaktionsgemische problemlos. Ein Mengenverhältnis von etwa 1 und ähnliches chromatografisches Verhalten von Edukt und Produkt unter allen getesteten Bedingungen erweisen sich jedoch als störend. Wird bei kleineren Ansätzen auf Rückgewinnung des 5'-Tosyl-2',3'-isopropylidenadenosins verzichtet, so hält man die entsalzte Reaktionslösung 10 Minuten auf 50°C und nutzt die sonst unerwünschte intramolekulare Cyclisierung des Tosyladenosins zum N^3-Adenosinsalz (Abb. 4) aus, das durch erneute Filtration über Kieselgel zu entfernen ist. Nach dieser Operation erlaubt es der Produktanteil, bei der anschließenden PSC-Reinigung an die Grenze der Trennkapazität pro Platte zu gehen. Bei Ansätzen von 2 mMol und darüber ist dieses Verfahren nicht praktikabel; es fällt auf, daß die Umsätze stark mit dem Reinheits- und Trocknungsgrad von 5'-Tosyl-2',3'-isopropylidenade-

nosin, KCN und Dioxan schwanken, 55 % aber nie übersteigen. Durch Passage von Dioxan p.A. über neutrales Aluminiumoxid, Aktivitätsstufe I, entfernt man letzte Salz- und Feuchtigkeitsspuren, durch rigoroses Trocknen erhält man wasserfreies KCN; es bleibt die Störanfälligkeit der Synthese durch Spuren von Kaliumtosylat oder cyclischem Adenosinsalz im Ausgangsmaterial, dessen Löslichkeit in Dioxan je nach Kristallgröße und -Struktur stark verschieden sein kann. Es bewährt sich Umkristallisieren aus Methanol, dann aus Essigester, um zu weitgehend salzfreiem und gut löslichem 5'-Tosyl-2',3'-isopropylidenadenosin zu kommen.

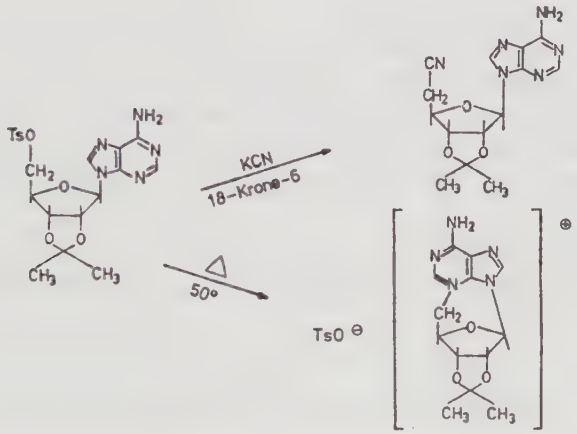


Abb. 4

Hohe Konzentrationen in der Reaktionslösung bedingen schnellere und effektivere Umsätze. Damit ist dem Stagnieren der Nitrilsynthese allerdings nicht abzuhelfen. Während der Reaktion sich anhäufendes Kaliumtosylat ist dank der Lipophilie des Anions mit 18-Krone-6 aus fester Phase besser extrahierbar als KCN wegen der niedriegeren Gitterenergie von $[K \cdot Krone]^+$ $Tosylat^-$. Mit fortschreitender Reaktion wird der Katalysator mehr und mehr festgelegt und der Umsatz bleibt auf einem Niveau stehen. Eine Konsequenz daraus ist für phasentransferkatalysierte S_N-Reaktionen die Umkehr der sonst gültigen Reihenfolge der Abgangsgruppen [52]. Für Iodide gilt das für Tosylate Gesagte in

noch stärkerem Maß, weil kronenetheraktiviertes Cyanid und Iodid miteinander konkurrieren. Nach den Kriterien der Phasentransferkatalyse wäre Chlorid am primären C die nucleofuge Gruppe der Wahl [52]; die verlustreiche Synthese von 5'-Desoxy-5'-chloradenosin (2',3'-isopropyliden) macht allerdings diese Alternative wenig attraktiv, sodaß wir an Tosylat als Ausgangsmaterial festhalten. Durch weitere Zugabe von Kronenether kommt die Reaktion nicht notwendigerweise wieder in Gang, weil die Kristalloberfläche des überschüssigen KCN mit Kaliumtosylat überwachsen und damit unzugänglich sein kann. Wir tauschen deshalb die feste Phase zweimal aus und geben eine weitere Menge 18-Krone-6 zu. So läßt sich der Umsatz bis auf ca. 80 % steigern. Säulenchromatografische Reinigung ergibt genügend reines Produkt für weitere Umsetzungen. Chromatografie bei erhöhter Temperatur oder über längere Zeit ist zu vermeiden, weil das Ausgansmaterial durchweg den größeren R_f-Wert als das Produkt aufweist und es damit zur Verschmierung von cyclischem Adenosinsalz über die gesamte Laufstrecke einschließlich Produktzone käme.
Nitrilsyntheseversuche mit 15-Krone-5 / NaCN statt 18-Krone-6 / KCN haben unter sonst identischen Bedingungen keinen Erfolg.

2.1.1.2. 6'-Pyrimidincarbonsäurenitrile aus Tosylaten

Die kritischen Punkte der Synthese von 5'-Desoxy-5'-cyanoadenosin gelten analog, wenn 5'-Tosyl-2',3'-isopropylidenuridin nach obigem Muster umgesetzt werden soll. Wegen der besseren Löslichkeit von Pyrimidinnucleosiden sind Dioxanlösungen ausreichender Konzentration leicht herzustellen.
Die Acidität des Protons am N-3 der Uridinbase lenkt die Reaktion jedoch in eine andere Richtung (Abb. 5). Kronenetheraktiviertes Cyanid reagiert wohl vorwiegend als Base; mit der Abspaltung des Protons am N-3 wird die Nucleophilie am O^2 erhöht. Intramolekularer Angriff des O^2 am 5'-C und Verdrängung von Tosylat führt zum O^2,5'-cyclischen 'Anhydro'-Nucleosid des 2',3'-Isopropylidenuridins. Die Cyclisierungsreaktion bringt nicht nur eine drastische Veränderung des Chromophors, der

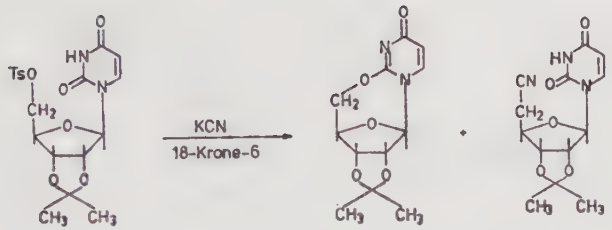


Abb. 5

Konformation und damit der gesamten spektralen Daten mit sich (Vgl. 2.1.5.1. und 2.1.5.2.), auch die Löslichkeit in Dioxan, Essigester etc. ist stark herabgesetzt. Das erleichtert die Abtrennung von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenuridin, das nur zu etwa 20 % anfällt: Aus eingeengter Reaktionslösung kristallisiert das Cyclonucleosid aus und mit Essigester ist das Nitril extrahierbar, das durch PSC rein erhalten wird. In Acetonitril durchgeführte Syntheseversuche unterscheiden sich in der Produktverteilung von denen in Dioxan nur graduell, sodaß die hier vorgestellte Reaktion eher als sehr verbesserter Zugang zu O^2,5'-Cyclouridin verstanden werden muß.(Die beschriebene Synthese setzt 5'-Desoxy-5'-iod-2',3'-isopropylidenuridin mit Silberacetat um [40]).

Aufgrund vorhandener Erfahrungen mit Uridinnucleosiden unter Nitrilsynthesebedingungen bietet sich aus der Reihe der Desoxyriboside - auch wegen denkbarer Verwendungen der davon abzuleitenden 6'-Nucleosidcarbonsäuren (S. 2.1.3.) - vorzugsweise Thymidin für weitere Versuche an. Die ausschließliche Tosylierung der 5'-Position und die geforderte Löslichkeit in wenig polaren organischen Lösungsmitteln macht die vorherige, reversible Blockierung der 3'-OH-Gruppe nötig; wir setzen 5'-Tosyl-3'-O-acetylthymidin unter Beachtung der bisher gewonnenen Erkenntnisse im System Dioxan / 18-Krone-6 / KCN um und erhalten, bedingt durch die Alkalilabilität der 3'-Acetylgruppe je nach Aufarbeitung verschieden komplexe Produktgemische mit O^2,5'-Cyclo-3'-O-acetyl- und 5'-Desoxy-5'-cyano-3'-O-acetylthymidin

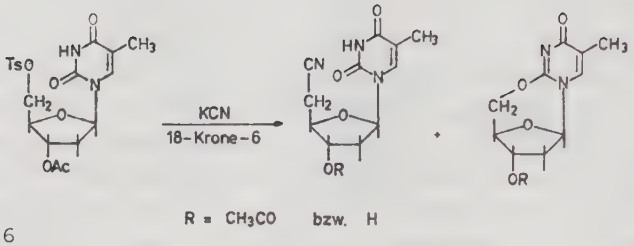
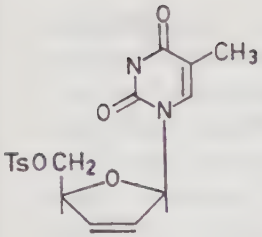


Abb. 6

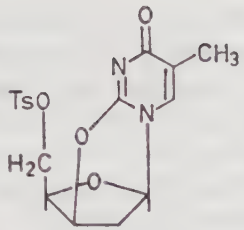
(R = CH_3CO) als Haupkomponenten. Wird nicht auf rigorosen Feuchtigkeits- und Alkoholausschluß geachtet, so bilden sich außerdem die entsprechenden ungeschützten Thymidine (R = H), deren chromatografische Auftrennung an Kieselgel mit Fließmitteln auf Chloroformbasis nicht zu erreichen ist (Abb. 6). Läßt man den von Unlöslichem und Lösungsmittel befreiten Reaktionsansatz 24 Stunden bei Raumtemperatur in Methanol stehen und trennt auf der Kieselgeldickschicht, verringert sich die Zahl der Substanzbanden erheblich. Aus der bei weitem intensivsten Bande eluiert man ein Gemisch aus 5'-Desoxy-5'-cyanothymidin und Thymin. Im Interesse besserer Ausbeute achten wir auf Abwesenheit von Wasser und Alkohol während der Reaktion. Sofortige Chromatografie zeigt, daß die Thyminbildung sich so völlig unterbinden läßt, nicht aber die partielle Acetylabspaltung aus 5'-Desoxy-5'-cyano-3'-O-acetylthymidin. Soll, wie in 2.1.3. beschrieben, weiter zur 6'-Thymidincarbonsäure umgesetzt werden, sind beide Nitrile, ungeschützt oder 3'-O-acetyliert, ohne Einschränkungen austauschbar.

Der dioxanunlösliche Rückstand der Thymidinnitrilsynthese enthält außer Salzen auch Folgeprodukte des 5'-O-Tosyl-3'-O-acetylthymidins, wie die spektroskopische Untersuchung eines Acetonextraktes beweist. Das FD-MS des aus Aceton umgefällten Rückstandes zeigt als Hauptkomponenten ungesättigte und / oder cyclo-Thymidinnucleoside an, die durch Essigsäureabspaltung aus O^2,5'-Cyclo-3'-O-acetylthymidin (a 1, a 2; Abb 7) hervorgehen können. Da im PMR-Spektrum des Gemisches aus dem Rückstand das intensivere Signal für die C-5-Methylgruppe bei höherem Feld liegt,

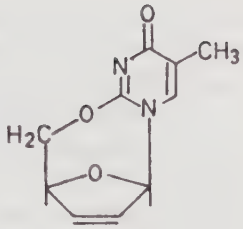


a1

M^+ : 378 (100 %)
$(M + H)^+$: 379 (96 %)



a2



b

M^+ : 206 (75 %)
$(M + H)^+$: 207 (22 %)

Abb. 7

muß für das Tosylthymidinnucleosid (es ist Hauptbestandteil) eine ungesättigte (a 1) und nicht eine O^2,3'-Cyclostruktur (a 2) (mit tieffeldverschobenem C-5-Methylsignal) favorisiert werden. Bisher bekannte, im Zucker ungesättigte Pyrimidinnucleoside sind 5'-Desoxy-4',5'-didehydro-2',3'-isopropylidenuridin [54], 3'-Desoxy-3',4'-didehydrothymidin [55] und 3'-Desoxy-2',3'-didehydrothymidin und -Uridin [56]; eine 4',5'-Didehydrostruktur würde hier den Verlust der 3'-O-Acetylgruppe (wie aus FD-MS, PMR, IR ersichtlich) nicht erklären, eine 3',4'-Doppelbindung wäre mit dem Signalmuster im PMR-Spektrum nicht vereinbar [55], sodaß nur die 2',3'- Didehydrostruktur in Frage kommt. Aufgrund derselben Überlegung ist für das Cyclothymidin (b) gleichfalls eine 2',3'-Doppelbindung zu fordern. Beide ungesättigten Nucleoside sind Produkte einer syn-Eliminierung (cis-konfigurierte Doppelbindung als Reaktionsprodukt), die zum Zuge kommt, wenn raumerfüllende Basen mit Ringsystemen reagieren [57]; unter Nitrilsynthesebedingungen ist ein O^2-anionisiertes Thymidinnucleosid als Base vorstellbar. Als weitere, mengenmäßig kleinere Komponente findet sich O^2,5'-Cyclo-3'-O-acetylthymidin im Rückstand.

Für die Verwendung als biochemische Modellverbindungen sollen die 5'-Cyanonucleoside freie 2',3'- bzw. 3'-Hydroxyle aufweisen, weil Wasserlöslichkeit und Variation nur eines Struk-

turparameters für aussagekräftige Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen gefordert wird. Unproblematisch ist die Freisetzung der 2' und 3'-OH-Gruppen von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin und -Uridin. Man läßt 7 Tage in 50 %iger Ameisensäure stehen und erreicht quantitative Ketalspaltung [35]. Die Entfernung des 3'-O-Acetylrests aus 5'-Desoxy-5'-cyano-3'-O-acetylthymidin in alkalischer Lösung bietet sich an; um Thyminbildung zu vermeiden, ist aber eine Alkoholyse in schwach HCl-saurem Methanol vorzuziehen. Auf die Tendenz der Nucleosidcarbonsäurenitrile zur Abspaltung der Nucleobase in alkalischer Lösung gehen wir unten noch genauer ein, ebenso auf chromatografische und spektroskopische Eigenschaften.

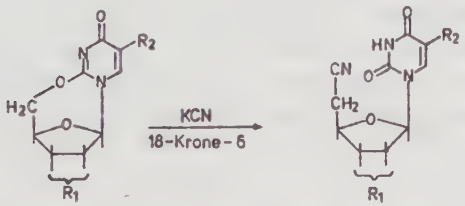
2.1.1.3. 6'-Pyrimidincarbonsäurenitrile aus O^2,5'-Cyclonucleosiden

Für viele Funktionalisierungen der Nucleobase oder des Zuckerrests sind O^2,5'-cyclo-Pyrimidinnucleoside ideale Ausgangsverbindungen [41]. Umsetzung von $O^2$5'-Cyclo-2',3'-isopropylidenuridin mit raumerfüllenden Basen wie t-Butylat führt zu 4',5'-ungesättigtem 5'-Desoxyuridin [54], nucleophiler Angriff am C-2 durch Ammoniak, Amine und S-haltige Nucleophile ergibt basenmodifizierte Pyrimidinnucleoside [41]. Über 5'-substituierte Thymodine und Uridine, die aus S_N-Reaktion am 5'-C hervorgehen, wird kaum berichtet, weil der Weg über das Cyclonucleosid - soweit überhaupt möglich - bisher größeren präparativen Aufwand erfordert als die direkte Umsetzung von 5'-Halogeniden oder Tosylaten. Unsere Synthese von Pyrimidincarbonsäurenitrilen ist wegen geringer Nitrilbildung (Uridin) bzw. komplexer Produktzusammensetzung (Thymidin) in dieser Hinsicht zwar wenig effektiv, macht aber $O^2$5'-Cyclopyrimidinnucleoside besser zugänglich.

Die beschriebene Umsetzung von 5'-Tosyl-2',3'-isopropylidenuridin mit KCN / 18-Krone-6 in Dioxan bei Raumtemperatur kann unverändert zur Synthese von Cyclouridin herangezogen werden;

Erwärmen bringt keinen weiteren Vorteil sondern führt zu Braunfärbung und verringerter Ausbeute. Die Cyclisierung von 5'-Tosyl- und 5'-Tosyl-3'-O-acetylthymidin erfordert dagegen unter sonst identischen Bedingungen höhere Temperaturen, um die Nitrilbildung zurückzudrängen. Problematisch ist die Reinigung von ungeschütztem Cyclothymidin, weil es sich in chromatografischen Verhalten und Löslichkeit von Kaliumtosylat kaum unterscheidet. Wenn in neutraler Lösung gearbeitet wird, ist eine Trennung am Anionenaustauscher erfolgreich. Die geschützten Cyclonucleoside sind durch fraktionierte Extraktion mit Dioxan / Essigester / Aceton zu reinigen; bei höheren Anforderungen an Salzfreiheit filtriert man durch Kieselgel mit Chloroform / Methanol 6:1.

Wir betrachten O^2,5'-Cyclonucleoside als neue Ausgangsverbindungen, weil sie für S_N-Reaktionen am 5'-C intern funktionalisiert sind. Da im Reaktionsverlauf kein Salz einer Abgangsgruppe anfällt, ist ein Reaktionsstillstand bei kronenetherkatalysierten Nitrilsynthesen nicht zu befürchten; Aufarbeitung und Reinigung sind erleichtert (Abb. 8).



R_1 = $-OC(CH_3)_2O-$
R_2 = H
} Uridin

R_1 = $OOCCH_3$ (3'), H (2')
R_2 = CH_3
} Thymidin

Abb. 8

Setzt man O^2,5'-Cyclo2',3'-isopropylidenuridin in Dioxan mit KCN / 18-Krone-6 bei Raumtemperatur um und chromatografiert nach 24 Stunden, eluiert man aus der einzigen intensiven Bande ein Uridinderivat, das in allen Kriterien mit authentischem 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenuridin übereinstimmt. Damit ist für die Umsetzung des Tosylats unter gleichen Bedingungen eine überzeugende Ergänzung gefunden worden.

Für erste, halbpräparative Versuche mit Cyclothymidin verwenden wir gesättigte Dioxanlösungen und setzen bei Raumtemperatur mit KCN / 18-Krone-6 um. Freies und 3'-O-acetyliertes Cyclothymidin reagiert in gleicher Weise: Von der Dünnschicht eluiert man ein Produkt, das nach allen chromatografischen und spektroskopischen Eigenschaften mit einer authentischen Vergleichsprobe übereinstimmt. Wohl wegen der geringen Cyclothymidinkonzentration bleibt der Umsatz etwas hinter den Erwartungen zurück. Für präparative Zwecke erfordern konzentriertere Dioxanlösungen wegen der Schwerlöslichkeit der Cyclothymidine Rückflußtemperatur, doch nehmen dann Nebenreaktionen überhand, begleitet von starker Braunfärbung des Reaktionsgemisches schon nach 15 Minuten. Als Nebenprodukte kommen unter anderem im Zucker ungesättigte Nucleoside in Betracht, wie sie durch Deprotonierung und darauffolgende O^2,5'-Bindungstrennung (bei Cyclouridin) oder Acetatabspaltung (bei Cycloacetylthymidin) entstehen. Diese Tendenz wird schon bei der Nitrilsynthese aus Tosylacetylthymidin beobachtet, wo im dioxanunlöslichen Rückstand ungesättigte Nucleoside gefunden werden (S. Seiten 20, 21).

Während die Darstellung von 6'-Uridincarbonsäurenitril via Cyclonucleosid ohne weiteres gelingt, ist über die analoge Synthese von Thymidincarbonsäurenitril noch kein abschließendes Urteil möglich, denn in diesem Fall bleibt der Nitrilanteil bei maximal 20 %.

Eine kürzlich veröffentlichte Synthese von 2'-Desoxy-2'-fluorcytidin mit KF / Kronenether geht ebenfalls vom Cyclonucleosid aus [58] und ist eine unabhängige Bestätigung für unser Konzept, Cyclonucleoside als intern funktionalisierte Ausgangsverbindungen für kronenetherkatalysierte S_N-Reaktionen einzusetzen.

2.1.2. Reaktionen der Nitrile

2.1.2.1. 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrile in wässrig-alkalischer Lösung

Die bei den Nitrilsynthesen angewandten Bedingungen (kronenetheraktiviertes Cyanid in wasserfreier Lösung) sind stark alkalisch, Nucleosidspaltung bleibt aber aus. Das bestätigt den für die Abspaltung der Nucleobase in wasserfreiem Alkali, einer allgemeinen Nucleosidreaktion, vorgeschlagenen Mechanismus mit der Bildung eines Alkoxidions und dessen direkten oder indirekten Angriff am C-1' [53]. Ionisierbare OH-Funktionen sind jedoch bei den eingesetzten Tosyl- und Cyanonulceosiden blockiert. Die Entstehung von Thymin bei der Aufarbeitung einer Cyanothymidinsynthese mit nicht wasserfreiem Methanol überrascht um so mehr (Vgl. S. 20). Weitere Hinweise auf außergewöhnliches Verhalten der 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrile erhalten wir bei Verseifungsexperimenten in wässrig-alkalischer Lösung. Diese Reaktionen verdienen aus allgemeinem und präparativem Interesse nähere Betrachtung.

Wenden wir die seit langem bekannte [59] und bei Cyanhydrin des Adenosinaldehyds erfolgreiche [25], sehr milde Verseifungsmethode mit Wasserstoffperoxid / NaOH auf Cyanoadenosin an, isolieren wir folgende drei Komponenten:

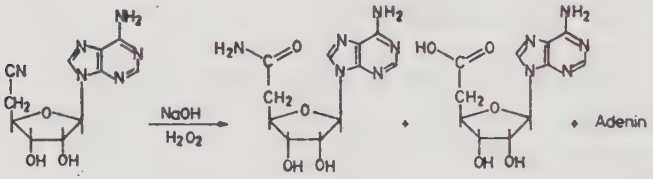


Abb. 9

Die Produktverteilung ist extrem pH-abhängig. Während der Anteil der 6'-Adenosincarbonsäure gering bleibt, ist Adeninbildung oberhalb pH 12 die Hauptreaktion, darunter überwiegt Hydrolyse zu 6'-Adenosincarbonsäureamid. Optimale Ausbeuten an Amid erhält man bei pH 10 ± 0,5 in schwach Carbonatgepufferter Lösung. Da das erwünschte Molekül, 6'-Adenosincarbonsäure, bei dieser Reaktion prinzipiell als Nebenprodukt anfällt, wird angestrebt, durch schrittweise Änderung der Reaktionsbedingungen den Carbonsäureanteil zu erhöhen und den Adeninanteil zu reduzieren. Variation von pH und Ionenstärke, veränderte Zusätze von Wasserstoffperoxid oder Borat, Steigerung der Temperatur und Ausdehnung der Reaktionszeit ändern jedoch nichts Grundsätzliches am Produktmuster. Für die weitere Verseifung des auf diesem Wege gut zugänglichen Säureamids kommen Natriumperoxid / Wasser [60] oder Braunstein / Aceton [61] in Betracht. Während mit Braunstein keinerlei Reaktion eintritt, erreicht man mit Natriumperoxid, vor allem bei erhöhter Temperatur, wiederum nur Adeninabspaltung. Alkalische Verseifungsversuche von 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrilen müssen auch deshalb generell als aussichtslos gelten, weil alle dargestellten 5'-Cyanonucleoside in wässrigem Alkali ebenfalls mit Spaltung der N-Glykosidbindung reagieren, unabhängig vom Zustand der Hydroxylgruppen und der Natur der Base.

Die Freisetzung der Nucleobase sollte deshalb einem einheitlichen Mechanismus folgen. Wir schlagen vor, daß nach Abstraktion eines Protons von der stark acidifizierten 5'-Methylengruppe der Furanosering geöffnet und die Base eliminiert wird:

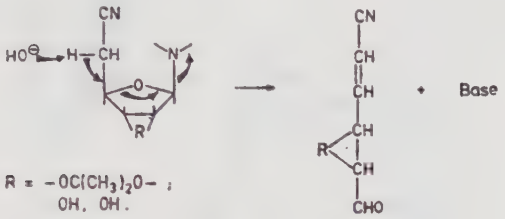


Abb. 10

Ein analoger Mechanismus ist auch für die alkalische Eliminierung der Base aus 5'-Sulfoniumsalzen des Adenosins verantwortlich [46]. Die Hydrolyse der N-Glykosidbindung und deren Kinetik läßt sich durch UV-Spektroskopie besonders gut bei Thymidin- und Uridincarbonsäurenitrilen untersuchen, da die Extinktionsmaxima von Nucleosidund Nucleobase in alkalischer Lösung sehr weit auseinander liegen. Die Kurvenscharen, die man durch Abfahren des Wellenlängenbereichs von 400 - 220 nm zu verschiedenen Zeiten nach NaOH - Zugabe erhält, geben auch Hinweise auf Konkurrenz- oder Folgereaktionen.

Für die Reaktion des 5'-Cyanouridins weist die Kurvenschar über den gesamten Beobachtungszeitraum einen isosbestischen Punkt bei 269 nm auf. Die Konzentrationen der Reaktionsprodukte stehen also in festem, zeitunabhängigen Verhältnis zueinander, Neben- und / oder Folgereaktionen laufen nicht ab, wie man aufgrund des Spaltungsmechanismus auch erwartet (Abb. 11).

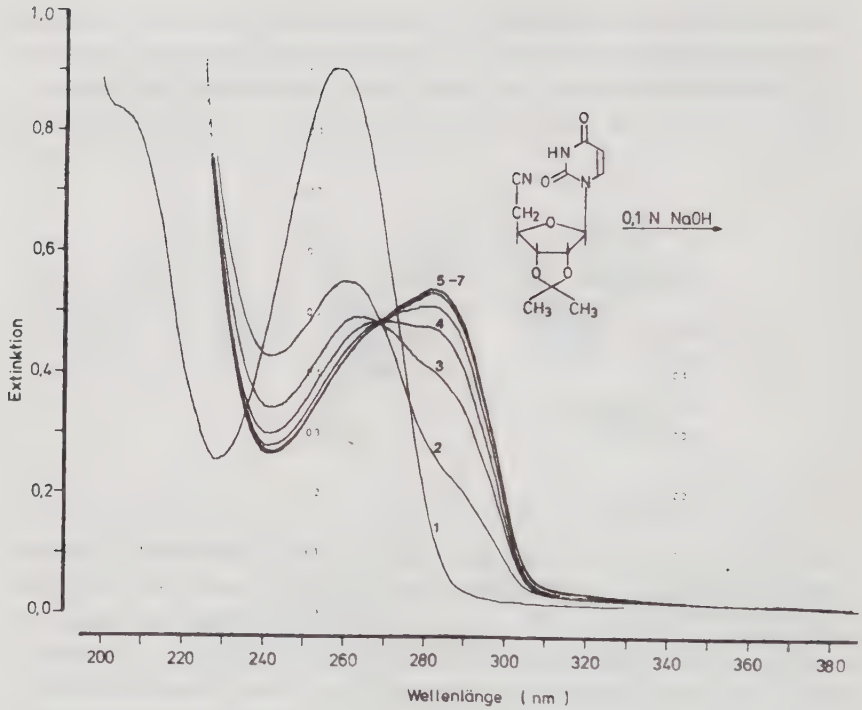


Abb. 11: UV-Spektrum vor NaOH-Zugabe (1) und 0,5 (2), 2,0 (3), 5,0 (4), 9,5 (5), 20 (6) und 75 (7) Minuten nach NaOH-Zugabe

Das Kurvenbild der Hydrolyse von 5'-Cyanothymidin ist anders (Abb. 12). Da nur für die ersten 20 Minuten der Reaktion ein isosbestischer Punkt (277 nm) beobachtet wird, ist eine schnelle Hauptreaktion zu wenigstens zwei Produkten und die langsame Folgereaktion eines Produkts zu diskutieren. Das nach 5 Stunden Reaktionszeit verbleibende Extinktionsmaximum bei der für Thymin typischen Wellenlänge von 293 nm, kann nicht vom Produkt der Folgereaktion herrühren: Während die Extinktion des Zwischenprodukts bei 321 nm abnimmt, geht auch die Extinktion des sich so ausbildenden Maximums bei 293 nm zurück. Das heißt aber, daß die Substanz mit λ_{max} = 293 nm (Thymin) nicht aus der Substanz mit λ_{max} = 321 nm hervorgeht. Durch das

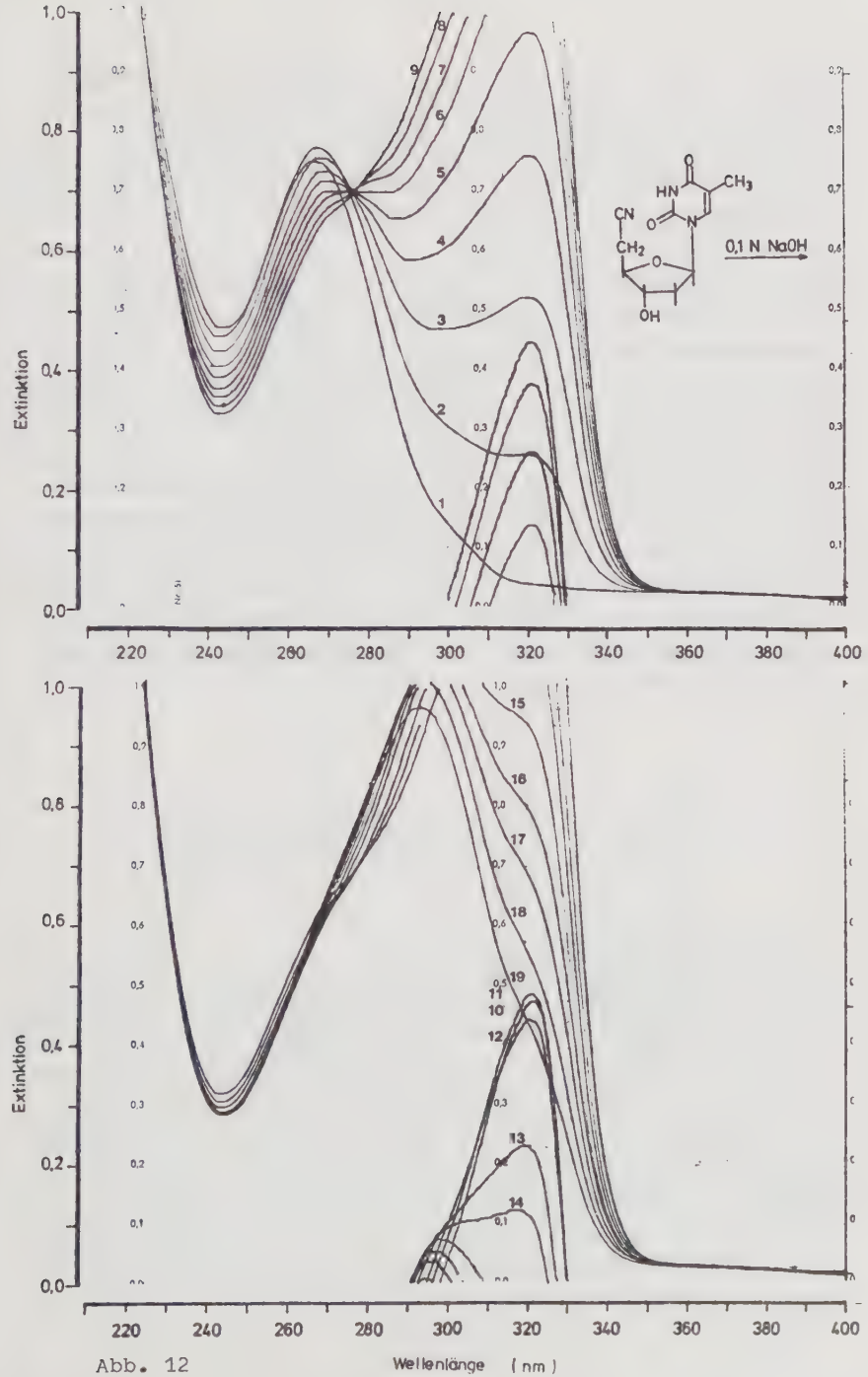

Extinktion
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
220
240
260
280
300
320
340
360
380
400
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
HN
CH3
CN
O
N
CH2
O
OH
0,1 N NaOH
Wellenlänge (nm)

Abb. 12

Legende zu Abb. 12 : 5'-Desoxy-5'-cyanothymidin in 0,1 N NaOH; UV-Spektren (Minuten nach Reaktionsbeginn): 1 (0,5); 2 (3,0); 3 (4,5); 4 (7,0); 5 (9,0); 6 (11,5); 7 (14,0); 8 (17,5); 9 (21,5); 10 (24); 11 (32); 12 (42); 13 (75); 14 (92); 15 (127); 16 (160); 17 (190); 18 (240); 19 (450).

Verschwinden der Absorption bei 321 nm wird die Bande bei 293 nm erst sichtbar. Bei Wiederholung der Reaktion in halbpräparativem Maßstab ist nur ein Produkt zu isolieren; es stimmt in allen chromatografischen uns spektroskopischen Kriterien mit Thymin überein. Versuche, die Reaktion durch Ansäuern zu stoppen und das Zwischenprodukt (λ_{max} = 321 nm) zu fassen, scheitern. Man muß aber davon ausgehen, daß es sich dabei um ein Folgeprodukt der Desoxyribose handelt und daß gegenüber dem Verhalten von 5'-Cyanouridin offenbar die 2'-Desoxy-Zuckerstruktur ausschlaggebend ist und nicht das Vorhandensein einer Methylgruppe am C-5. Damit ist eine Erweiterung des oben diskutierten Spaltungsmechanismus für 5'-Desoxy-5'-cyano-2'-desoxynucleoside erforderlich (Abb. 13) :

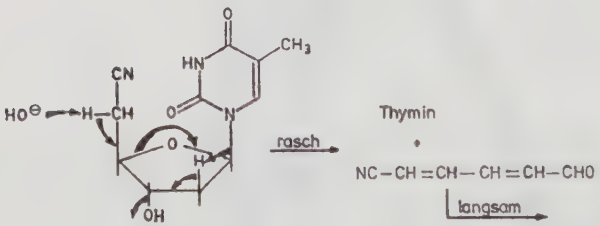


Abb. 13

Der aus dem Desoxyriboserest sich möglicherweise bildende zweifach ungesättigte Aldehyd 5-Cyano-pentadi-2,4-en-1-al mit konjugierter ω-ständiger Cyanogruppe ist aus der Literatur [62] bekannt; sein Absorptionmaximum liegt in Ethanol bei 263 nm, UV-Daten für wässrige Lösungen bei verschiedenen pH-Werten werden jedoch nicht angegeben. Wenn man die Lösung des Thymidinderivats zum Zeitpunkt maximaler Extinktion bei 321 nm neutral bis schwach sauer macht, zeigt das UV-Spektrum spontan und reversibel ein Maximum bei 265 nm. Das ist ein weiteres Argument für die Identität des Zwischenprodukts mit dem erwähnten Aldehyd. Alternative Versuche, das ungewöhnliche Verhalten von 5'-Cyanothymidin mit einer Reaktion des 5'-Endes mit der Nucleobase zu erklären, stehen nicht nur im Widerspruch zu kinetischen Daten, auch ein fast bandenleeres CD-Spektrum zum Zeitpunkt maximaler Extinktion bei 321 nm ist mit einer cyclo-Struktur des Zwischenprodukts mit intakter Glykosidbindung nicht vereinbar. Außerdem sind keine substituierten Thymine in den Endprodukten nachweisbar.

2.1.2.2. Selbstkondensation von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin

Da wir die Glykosidspaltung bei 5'-Cyanonucleosiden auf C-H-Acidität zurückführen, liegt es nahe, das C-H-acide Verhalten mit einer darauf ausgerichteten Kondensationsreaktion zu belegen. Zu diesem Zweck wird eine konzentrierte Lösung von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin in Aceton mit wenig 50 %iger wässriger KOH 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Neben Adenin entsteht eine Substanz mit höherer Lipophilie als das Ausgangsmaterial, die jedoch nicht ein einfaches Kondensationsprodukt mit Aceton sein kann. Das mit FD-MS ermittelte, unerwartet hohe Molekulargewicht von 497 (M^+ 497

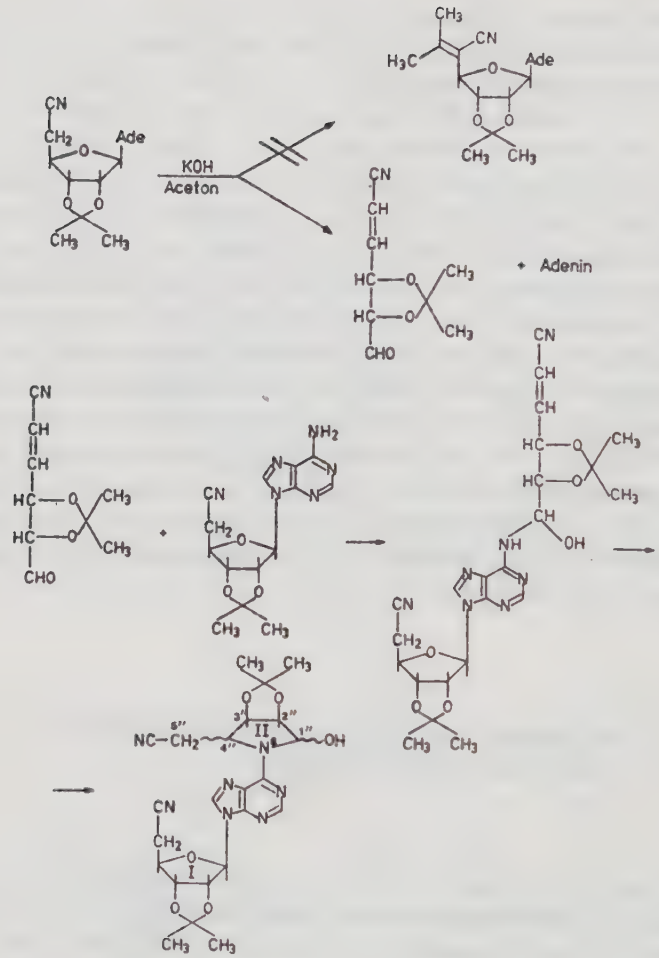


Abb. 14 : Selbstkondensation von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin in Aceton mit 50 %iger wässriger KOH

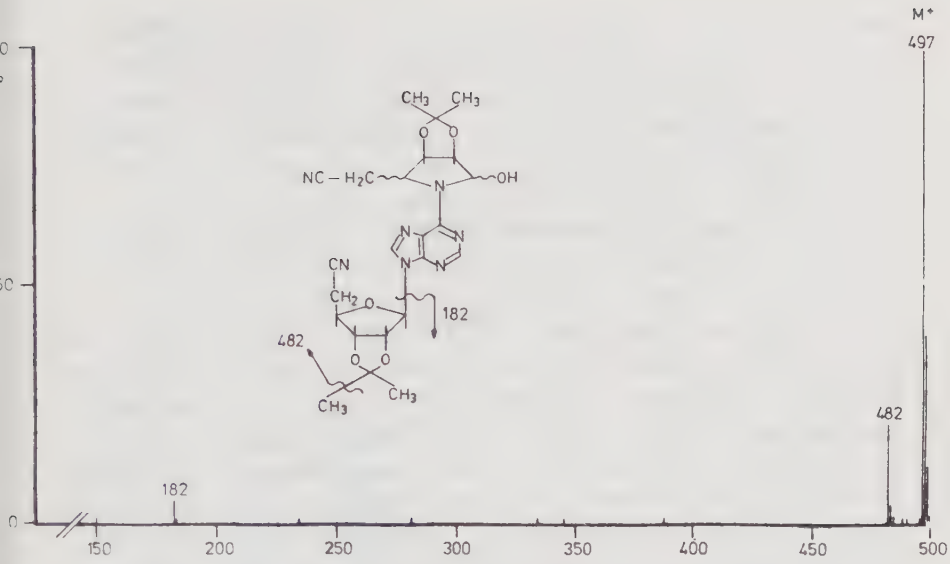


Abb. 15 : FD-MS des Selbstkondensationsprodukts von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin

(100%); $(M+H)^+$ 498 (40%); $(M+2H)^+$ 499 (12%)) ist um einen unversehrten Zuckerrest (181) größer als das des geschützten Nitrils; weitere Fragmente sind $(M-CH_3)^+$ 482 mit 21 %, $(M+H-CH_3)^+$ 483 mit 4 %, $(M-Zucker-Adenin-H)^+$ 182 mit 5 % und $(M-Zucker-Adenin)^+$ 183 mit 1 % relativer Intensität (Abb. 15), ein Adeninfragment fehlt.

Das PMR-Spektrum (Abb. 16) der gereinigten Substanz zeigt Doppelpeaks im Resonanzbereich der H-8 und H-2-Protonen, überlagerte Multipletts im Gebiet der Zuckerprotonen und neben den intensiven Methylsinguletts der Isopropylidenschutzgruppe weitere Paare von Singuletts geringer Intensität; N-H-Protonen

und olefinische Protonensignale fehlen. Das C-5'-Protonensignal ist an unveränderter Position gegenüber 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin, aber von höherer Intensität und komplexerer Feinstruktur. Veränderungen des IR-Spektrums sind im Valenzschwingungsbereich besonders drastisch: Verschwinden der N-H-Valenzschwingung, Intensivierung der C≡N-Valenz, der aliphatischen C-H-Banden und starke Verschiebung der C=N-Bande zu kürzeren Wellenzahlen. Die UV-Daten (pH 1 : λ_{max} = 266 nm; pH 7 : λ_{max} = 264/208 nm; pH 12 : λ_{max} = 272 nm) bestätigen, daß sich am N^6 offenbar kein Proton mehr befindet; nach der pH-Abhängigkeit des Absorptionsmaximums ist die neue Substanz direkt mit N^6-Dimethyladenosin vergleichbar (pH 1 : λ_{max} = 267 nm; pH 6 : λ_{max} = 273 nm; pH 12 : λ_{max} = 273 nm). Nach allen spektroskopischen Befunden müssen wir daher annehmen, daß die N^6-Aminogruppe eines Cyanonucleosidmoleküls primär mit dem durch basische Eliminierung von Adenin aus einem weiteren Cyanonucleosidmolekül freigesetzten Aldehyd reagiert hat; zur Wasserabspaltung kommt es nicht (vgl. FD-MS, Abb. 15), sondern zum erneuten Ringschluß durch nucleophilen Angriff auf die elektronenarme C-4",C-5"-Doppelbindung unter Verlust einheitlicher Konfiguration am C-1" und C-4". Das Molgewicht und alle spektroskopischen Befunde sind mit der Zusammensetzung $C_{23}H_{27}N_7O_6$ (MG = 497) und der in Abb. 17 dargestellten Struktur eines 6[N (2"-Hydroxy-3",4"-O-isopropyliden-5"-cyanomethylpyrrolidinyl)]-9[1'-β-D-(2',3'-O-isopropyliden-5'-desoxy-5'-cyanoribofuranosyl)] purins zu vereinbaren.

Das Auftreten von Doppelpeaks im PMR-Spektrum für H-2 (7,92 und 7,95 ppm, $\Delta\delta$ = 0,03 ppm) und H-8 (8,45 und 8,46 ppm, $\Delta\delta$ = 0,01 ppm), Protonen, die mit keinem anderen koppeln, ist nur so zu erklären, daß die isolierte Substanz ein Gemisch stereoisomerer Verbindungen darstellt, die sich je nach Wechselwirkung mit dem Puringerüst in zwei Gruppen einteilen lassen. Die unterschiedliche Beeinflussung der chemischen Verschiebung der Purinprotonen muß auf Wasserstoffbrücken beruhen, die sich zwischen Purin und C-1"-OH ausbilden: Entweder kommt zwischen N-1 und 1"-OH (A in Abb. 17) eine Wasserstoffbrücke zustande

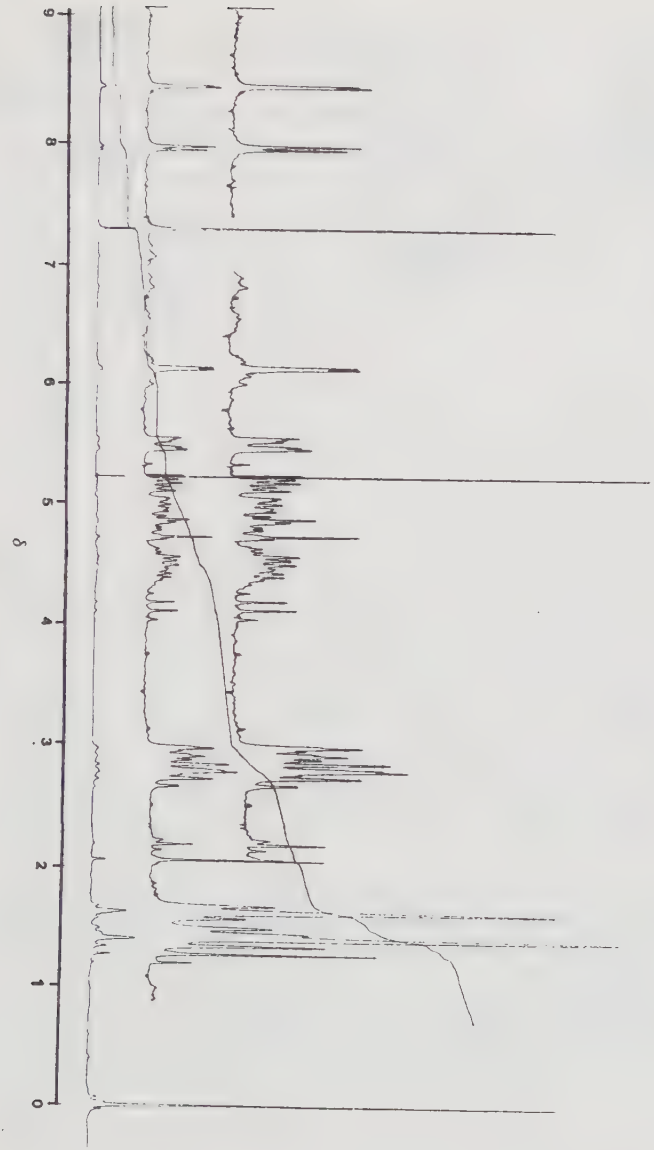
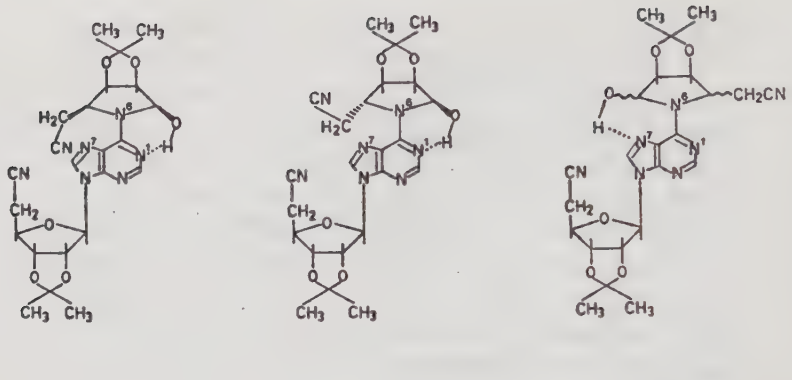


Abb. 16 : PMR-FT-Spektrum des Selbstkondensationsprodukts von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin in $CDCl_3$ mit Tetramethylsilan als internem Standard



A1 A2 B1, B2

Abb. 17

oder zwischen N-7 und 1"-OH (B). Vergleichbare Wasserstoffbrücken kennt man zwischen N-1 und dem NH einer an N^6 gebundenen Aminosäure in der Kristallstruktur der hypermodifizierten tRNA-Nucleoside N-(Purin-6-ylcarbamoyl)-glycinribosid und -L-threoninribosid [63, 64]. Konsequenz ist in jedem Fall eine hohe Rotationsbarriere der C-6-N^6-Bindung, sodaß bei Raumtemperatur zwei stabile Konformere, A und B (Abb. 17) unterscheidbar sein müssen. Zusätzlich begünstigt wird diese Konformationsfixierung durch den generellen Doppelbindungsanteil der C-6-N^6-Bindung; schon im vergleichsweise niedrig substituierten N^6-Dimethyladenin ist die Rotationsbarriere mit 60 $kJMol^{-1}$ beachtlich hoch [65]. Die PMR-Spektren der Konformeren A und B sollten sich in der chemischen Verschiebung für H-2 stärker unterscheiden als in der für H-8: Da die anti-Konformation der Base generell bevorzugt ist, fehlen direkte Einflüsse durch polare 5'-Substituenten auf die chemische Verschiebung von H-2, um so stärker muß sich An- oder Abwesenheit einer H-Brücke zum N^1 auswirken. Bei H-8 dagegen ist die Nachbarschaft von polaren, hier der exocyclischen 5'-Cyanogruppe, ohnehin gegeben; die Existenz einer H-Brücke zum N-7 kann nur noch einen kleinen Shiftunterschied für H-8 ausmachen. Diese Interpretation der verschieden großen Shiftunterschiede $\Delta\delta$ ($\Delta\delta$H-2 > $\Delta\delta$H-8) wird noch zwingender, wenn die 5"-Cyanofunktion in die Betrachtung

mit einbezogen wird. Liegt Konformer A vor (N-1···H-O), kommt H-8, ohnedies schon im Einflußbereich von 5'-CN, zusätzlich in die Umgebung der 5"-Cyanogruppe. In Konformer B (N-7···H-O) hat die 5"-Cyanofunktion zu großen Abstand von H-2, als daß sie auf H-2 Auswirkungen haben könnte. Ein Übergang von Konformer A zu Konformer B bedeutet also für H-8 nur einen Austausch polarer Nachbarschaftswechselwirkungen (5"-CN gegen N-7-H-Brücke), während es für H-2 um An- oder Abwesenheit der N-1-H-Brücke geht.

Mit den relativen Konfigurationen an C-1" und C-2", 1"-OH und C-4"-CH_2CN auf der gleichen Seite des Zuckerrings II (cis, 1) oder auf verschiedenen Seiten (trans, 2), müssen zunächst vier Strukturen unterschieden werden: Konformer A, cis (A1) und trans (A2) konfiguriert sowie cis (B1) und trans (B2) konfiguriertes Konfomer B. Am Modell wird klar, daß cis- oder trans-Anordnung der Substituenten vor allem für die chemische Verschiebung und Feinstruktur des C-5"-Protonensignals verantwortlich ist. Bezieht man die sterische Anordnung der 2",3"-Isopropylidengruppe mit ein, werden 4 isomere Substituenten am N^6 und damit 4 Konformerenpaare unterscheidbar. Daraus erklärt sich die Häufung von Methylsignalen geringer Intensität zwischen 1,3 und 1,7 ppm, jedoch ist es schwierig, daraus Häufigkeiten der gebildeten Produkte abzuleiten.

Dieses Reaktionsbeispiel läßt eine Fülle von weiteren präparativen Verwendungen von 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrilen erwarten. Es liefert eine Erklärung für die Bildung von Adenin und der sehr lipophilen Substanz, die in gealterten Lösungen von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin regelmäßig auftaucht.

2.1.3. Nucleosidcarbonsäureester und Nucleosidcarbonsäuren

Da unter alkalischen Bedingungen die Verseifung von 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrilen zu den Carbonsäuren in präparativem Maßstab auch stufenweise nicht möglich ist, muß saure Hydrolyse versucht werden. Die bekannte Säurelabilität der N-Glykosidbindung verbietet längere Säureeinwirkung und erhöhte Temperaturen. Dementsprechend kommt am ehesten eine Alkoholyse der Nitrile via Iminoesterhydrochloride zu Estern in indifferenten Lösungsmitteln mit trockenem HCl in Frage [66]. Bei typischen Beispielen aus der organischen Synthese setzt man mit äquivalenten Mengen Alkohol in absolutem Ether bei -10°C um. Erfahrungen mit diesem Reaktionstyp aus dem Bereich der Nucleosidchemie fehlen bisher.

2',3'-Isopropylidenadenosin in Mischungen aus Ether oder THF und Methanol oder Ethanol dienen für Vorversuche. Selbst nach 24 Stunden in HCl-gesättigter Lösung bei -16°C beobachten wir keine Adeninbildung, sonder nur vollständige Abspaltung der Isopropylidengruppe. Setzt man 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin in THF mit 3 Äquivalenten Methanol und trockenem HCl um, dann isoliert man nach Dünnschichtchromatografie des hydrolysierten Iminoesterhydrochlorids ein neues Adenosinnucleosid, dessen UV-Spektrum in alkalischer Lösung unverändert bleibt. FD-MS, PMR und IR belegen zusätzlich die Struktur als 2',3'-ungeschützter 6'-Adenosincarbonsäuremethylester (Abb. 18).

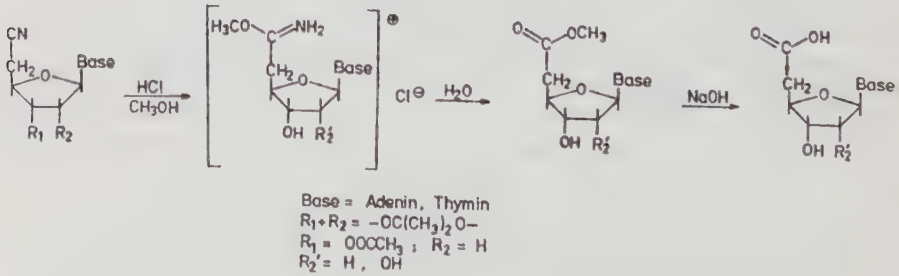


Abb. 18 : Darstellung von 6'-Nucleosidcarbonsäuren aus 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrilen

Unangenehm ist jedoch die Verunreinigung des Esters mit THF-Folgeprodukten; wegen geringer Löslichkeit des Nitrils eignet sich aber Ether noch weniger als THF. Wir führen die Reaktion deshalb direkt in Methanol aus und registrieren weder Adeninbildung noch geringere Esterausbeuten. Die gleichermaßen erfolgreiche Methanolyse von 5'-Desoxy-5'-cyano-3'-O-acetylthymidin zu 6'-Thymidincarbonsäuremethylester zeigt, daß auch die noch labileren 2'-Desoxynucleoside ohne Glykosidspaltung umgesetzt werden können. Durch Variation der Alkoholkomponente dürfte eine Palette verschiedener Ester von einem Nitril darstellbar sein, so z.B. in Ethanol der Ethylester der 6'-Adenosincarbonsäure. 5'-Tosyl- und Cyclonucleoside stören die Estersynthese nicht, sodaß auch Nitrilpräparationen, die noch Ausgangsmaterial enthalten, eingesetzt werden können. Wird auf Rückgewinnung nicht umgesetzten Nitrils verzichtet, so schließt man alkalische Verseifung des Esters direkt an, ohne dabei die Reinigung der Säure über Ionenaustauscher zu beeinträchtigen. Andernfalls trennt man Nucleosidcarbonsäurenitril und -Ester vorher durch Chromatografie. Ein nicht unerwünschter Nebeneffekt der Alkoholyse mit HCl ist die gleichzeitige Abspaltung der Schutzgruppen, da Nucleosidcarbonsäure für weitere Verwendung ohnedies freie 2',3' (bzw. 3')-OH-Gruppen tragen sollen. Die bislang unbeachtete Säurestabilität von Nucleosiden unter den oben angewandten Bedingungen und die Resistenz der Nucleosidcarbonsäureester gegen basische N-Glykosidspaltung kommen der Darstellung der Nucleosidcarbonsäuren sämtlich entgegen. Ihre Vorteile liegen in der Vielseitigkeit bezüglich der Alkohol-und Nitrilkomponente, in einer geringen Störanfälligkeit und in der Möglichkeit, die Darstellung der Carbonsäure ab Nitril, einschließlich Abspaltung der Schutzgruppen, als 'Eintopfreaktion' durchzuführen.

2.1.4. 6-Modifizierte Purinriboside

6'-Adenosincarbonsäureamid ist aus 5'-Cyanoadenosin zwar leicht verfügbar, aber unter allen getesteten Reaktionsbedingungen nicht zur Carbonsäure zu verseifen. Die alkalische Hydrolyse des 5'-C-Adenosincarboxamids scheitert gleichfalls [24], sodaß die Synthese der entsprechenden Carbonsäure erst durch Behandlung von 5'-C-Nitromethyladenosin mit $NaNO_2$ / Alkylnitrit erreicht wird, ohne dabei die C-6-Aminogruppe zu gefährden. Da dieser Umweg bei den vorliegenden 6'-Adenosincarbonsäurederivaten ausgeschlossen ist, wird geprüft, ob nitrosierende Reagenzien zur Amidhydrolyse brauchbar sind. Setzt man 6'-Adenosincarbonsäureamid in Acetonitril mit $NO^+BF_4^-$ bei 0^oC um und erwärmt am Ende der Stickstoffentwicklung auf 50^oC [67], isoliert man nach Hydrolyse ein Produkt, dessen UV-Daten weder mit einem Adenosin- noch mit einem Inosinderivat vereinbar sind. Stark nitrosierende Reagenzien greifem offenbar nicht nur am N^6 an, deshalb sind hier alle Amidspaltungsmethoden mit Nitrosoniumsalzen unbrauchbar. Schonende Bedingungen wie $NaNO_2$ in essigsaurer Lösung [68] lassen die Amid-NH_2-Funktion unangetastet, hydrolysieren jedoch in bekannter Weise die N^6-Aminogruppe und führen zum Amid des IMP-analogen Modellnucleotids 6'-Inosincarbonsäure. Da die Biosynthese aller Purinnucleotide von IMP ausgeht und die beteiligten Enzyme noch genauerer Untersuchung bedürfen, sind auch Modellverbindungen aus der Inosinreihe durchaus von Interesse.

Bisher bekannt ist 5'-Inosincarbonsäure, die aus Inosin mit Chrom(VI)oxid in Eisessig erhalten wird [30]; Umsetzung mit Alkoholen führt zu Inosincarbonsäureestern [31]. Aufgrund der entwickelten Synthesen stehen uns die Adenosinderivate der 6'-Nucleosidcarbonsäuren zur Verfügung, daher liegt es nahe, die bei 6'-Adenosincarbonsäureamid erfolgreiche Desaminierungsmethode auch auf alle anderen Adenosincarbonsäurederivate anzuwenden.

Die Darstellung von 6'-Inosincarbonsäurenitril und -Methylester bietet ebenfalls keine Probleme; etwas geringere Umsätze stören nicht, weil unverändertes Ausgansmaterial vollständig zurückerhalten wird. Die Umsetzung der 5'- und 6'-Adenosincarbonsäure gelingt ebenfalls. Durch die Schwerlöslichkeit der (undissoziierten) Nucleosidcarbonsäuren in wässrigen Säuren wird die Ausbeute etwas beeinträchtigt. Die Auftrennung von Inosin- und Adenosincarbonsäure am Anionenaustauscher ist jedoch problemlos, wenn zur Elution flache pH-Gradienten (Ameisensäure) verwendet werden. Damit ist ein alternativer Weg zu 5'-Inosincarbonsäure aufgezeigt.

Für die Synthese weiterer C-6-variierter Purinriboside kann 6-Chlorpurinribosid mit N- und S-haltigen Nucleophilen umgesetzt werden [68]. Falls eine Kronenetherkatalysierte Nitrilsynthese mit diesem Ausgangsmaterial zum Ziel führte, stünden 6-Cyano- und nach Hydrierung 6-Aminomethylpurinribosid als interessante Nucleosidanaloge zur Verfügung, mit denen direkt oder als 5'-Phosphat die Bedeutung der relativen Position der Aminogruppe zur Purinbase für die Funktion des Adenosins und der Adenosinnucleotide abgetastet werden könnte. Wendet man die oben beschriebenen Nitrilsynthesebedingungen auf 2',3'-ungeschütztes 6-Chlorpurinribosid an, so tritt auch nach mehreren Tagen bei Raumtemperatur keine Reaktion ein; Rückflußtemperaturen erlauben höhere Konzentrationen, bringen aber die gewünschte Reaktion nicht in Gang. Um bessere Löslichkeit in Dioxan oder Acetonitril zu erreichen, stellten wir 6-Chlorpurin-2',3'-isopropylidenribosid her [69] und setzten mit KCN / 18-Krone-6 um. Auch nach Anwendung höherer Temperaturen kann unter den gefärbten, zum Teil fluoreszierenden Reaktionsprodukten kein Nitril nachgewiesen werden. Obwohl die S_N-Reaktionen am aromatischen C-6 des Chlorpurinribosids zahlreich beschrieben sind und Chlorid nach Kriterien der Phasentransferkatalyse eine gute Abgangsgruppe darstellt [52] gelten für kronenetherkatalysierte Reaktionen an aromatischen Zentren von Heterocyclen offenbar besondere Gesetzmäßigkeiten.

2.1.5. Spektroskopische Daten

2.1.5.1. Strukturbeweise

Die Identität aller in dieser Arbeit neu beschriebenen Verbindungen ist durch Interpretation von UV-, CD-, IR-, MS-, FD-MS- und PMR-Spektren bestimmt und in ihrem Ergebnis in den Abschnitten 2.1.1.1. bis 2.1.4. schon vorweggenommen worden. Jedoch erst eine genauere Betrachtung spektroskopischer und auch chromatografischer Details vermittelt für die gesamte Gruppe von Nucleosiden ein umfassendes Bild der Eigenschaften, deren Abstufung und Verhältnis zu Vergleichssubstanzen.

Adenosine

Alle dargestellten, 5'-modifizierten Adenosinnucleoside zeigen im UV in neutraler Lösung das für Adenosine typische Maximum bei 258 nm; nach einem Minimum im Bereich von 225-235 nm, dessen genaue Lage und relative Extinktion als qualitatives Kriterium für die Reinheit einer Probe genommen werden kann, registriert man zum Kurzwelligen hin ein weiteres Maximum bei 207 nm. In saurer Lösung sind die Spektren auf ein einziges Maximum bei 257 nm reduziert. Während das Absorptionsmaximum aller anderen 6'-Adenosincarbonsäurederivate, einschließlich der Säure, in alkalischer Lösung bei 259 nm in Lage und Extinktion unverändert bleibt, verschieben sich die λ_{max}-Werte des 2',3'-geschützten und ungeschützten 6'-Adenosincarbonsäurenitrils zeitabhängig zum Langwelligen hin; nach 5 Stunden registriert man ein reines Adeninspektrum mit λ_{max} = 268 nm (Dieses Verhalten ist in 2.1.2.1. erklärt). Das normale Adenosinspektrum der Nitrile in neutraler Lösung zeigt, daß die Nitrilgruppe, deren Vorhandensein aufgrund des IR-Spektrums (C≡N-Valenzschwingung bei 2250 cm^{-1}) zweifelsfrei ist, sich nicht an der Base befinden kann. Das wird auch durch das fragmentarme FD-MS des Isopropylidencyanoadenosins bestätigt, das außer dem Signal mit der erwarteten Massenzahl 316 für $C_{14}H_{16}N_6O_3$ (100 %) auch ein intensives Signal für das nach Abspaltung von Adenin freigesetzte Zuckerfragment $(M-Adenin)^+$

bei 182 Masseeinheiten (3,8 %) enthält. Das normale MS entspricht weitgehend dem für 2',3'-Isopropylidenadenosin gefundenen Fragmentierungsmuster [33]. Das Basissignal bei 218 entsteht aus dem Molekülion durch Abspaltung von Aceton und dem Radikal CH_2CN. Die Linien für $(M-CH_3)^+$ und $(M-Aceton)^+$ stimmen in ihren relativen Intensitäten mit den entsprechenden Signalen im Spektrum des Isopropylidenadenosins überein. Auch alle übrigen typischen Adenosinfragmente (164, 134/135 (Adenin), 108) sind als prominente Signale vorhanden. Auffälligerweise fehlt hier das Bruchstück $(M-CH_2CN)^+$, während es im MS des ungeschützten Cyanoadenosins vorhanden ist. Auch dessen Fragmente (218/219, 164, 134/135 (Adenin, 100 %) und 108) sind Adenosin-typisch. Einen weiteren Beweis für die 5'-Cyanostruktur liefern die PMR-Spektren in DMSO-d_6, Methanol-d_4 (Isopropylidenverbindung) und D_2O (ungeschütztes Nucleosid). Die 5'-Protonen des Adenosins sind bei 3,75 ppm in Resonanz, dagegen werden die der 5'-Cyanoadenosine durch die weniger entschirmende Wirkung einer Cyanofunktion um etwa 0,7 ppm zu höherem Feld verschoben. Wie man für die Kopplung zweier äquivalenter Protonen mit einem vicinalen Proton erwartet, erscheint das H-5'-Signal der Nitrile als Dublett, während das gleiche Signal des Adenosins durch zusätztliche, geminale Kopplungen eine komplexere Feinstruktur erhält. Die Signale der Purinprotonen H-8 und H-2 liegen beim geschützten (DMSO-d_6: H-8: 8,40 ppm; H-2: 8,24 ppm)und ungeschützten Nitril (D_2O: 8,29 und 8,19 ppm) im erwarteten Bereich. In Methanol beobachtet man nur ein einziges Signal für die Purinprotonen (δ = 8,24 ppm), sodaß man Lösungsmitteleffekte in ihrer Auswirkung auf die chemische Verschiebung der Purinsignale stärker als bisher beachten muß, zumal die Shiftdifferenzen der Basenprotonen mit der Konfomation von Nucleosiden und Nucleotiden in engem Zusammenhang stehen [70,71].

Das FD-MS-Spektrum von 6'-Adenosincarbonsäureamid weist mit 294 (M^+,33 %) und 295 ($(M+H)^+$, 100 %) die nach der Bruttozusammensetzung erwartete Massenzahl aus; wegen der Schwerflüchtigkeit liefern weder Amid noch Carbonsäure herkömmliche Massenspektren. Für die Bestätigung der geforderten Carboxamidstruktur ist besonders das PMR-Spektrum in DMSO-d_6 wichtig,

weil es außer des breiten Signals der C-6-Aminogruppe bei 7,40 ppm ein weiteres Signal gleicher Form und Intensität bei 6,89 ppm enthält, das für Amidprotonen typisch ist. Das 5'-Methylenprotonensignal des Amids bei 2,82 ppm (D_2O) ist gegenüber dem Nitril noch weiter zu tieferem Feld verschoben (Nitril, D_2O: 3,16 ppm). Bemerkenswert ist auch die unterschiedliche Feinstruktur der H-5'-Signale: Während es beim 6'-Adenosincarbonsäurenitril ein reines Dublett ist, liegt beim 6'-Adenosincarbonsäureamid ein Multiplett vor. Das kann durch die Ausbildung inter- und intramolekularer H-Brücken über die Amid-NH_2-Funktion bedingt sein, die beim Nitril ausgeschlossen sind.

Das FD-MS des 6'-Adenosincarbonsäuremethylesters bestätigt die mit 309 (M^+, 100 %) errechnete Masse; weitere prominente Fragmente sind 310 ($(M+H)^+$, 70 %), 135 ($(Adenin+H)^+$, 34 %). Ein Signal bei 349 (2 %) beweist, daß die Probe zusätzlich Reste des 2',3'-isopropylidengeschützten Esters enthält. Aussagekräftigste Bande des IR ist die C=O-Estervalenzschwingung bei 1740 cm^{-1}. Das PMR-Spektrum bestätigt in allen Punkten die Struktur des 6'-Adenosincarbonsäuremethylesters: Intensives Singulett der Ester-O-methylprotonen bei 3,70 ppm, 5'-Methylenprotonenabsorption bei 2,96 ppm mit ähnlicher Verschiebung wie im Amid (2,82 ppm). Vergleichsweise gering ist der Shiftunterschied der Purinprotonen $\Delta\delta$ = 0,04 ppm (Nitril: 0,1 ppm, Amid: 0,05 ppm; jeweils in D_2O).

Weit größer ist die Shiftdifferenz von H-8 und H-2 ($\Delta\delta$ = 0,12; D_2O, pD 7,0) bei der 6'-Adenosincarbonsäure; die starke pH-Abhängigkeit des Signalabstandes ist neben dem eindeutigen FD-MS ein zwingender Strukturbeweis. Neben dem Basispeak 296 ($(M+H)^+$ 100 % und den Signalen 295 (M^+, 4 %), 135 ($(Adenin+H)^+$, 4 %), 160 ($(M-Adenin)^+$, 1 %) ist die Linie bei 251 ($(M-CO_2)^+$, 3 %) eine zusätzliche Bestätigung für die Struktur der 6'-Adenosincarbonsäure.

Inosine

Da die oben umfassend charakterisierten Adenosincarbonsäurederivate durch Desaminierung zu den entsprechenden Inosincarbonsäurederivaten umgesetzt werden, kann man sich bei deren Charakterisierung im Wesentlichen auf drei Aspekte beschränken: Kurzwelliges UV-Maximum, intakte Glykosidbindung und Verlust der C-6-Aminogruppe. Alle dargestellten Inosincarbonsäuren und -Derivate haben in saurer Lösung das Inosin-typische Absorptionsmaximum bei 248 nm, in neutraler und alkalischer Lösung bei 254 nm (Inosincarbonsäurenitril und -Methylester) bzw, 253 nm (6'-Inosincarbonsäure, -Amid und 5'-Inosincarbonsäure). Schon die in alkalischer Lösung unverändert kurzwelligen UV-Maxima beweisen, daß es sich, trotz der stark sauren Bedingungen bei ihrer Synthese, um intakte Inosinnucleoside handeln muß (Hypoxanthin in alkalischer Lösung λ_{max} = 264 nm). Dies wird weiter erhärtet durch das für eine intakte N-Glykosidbindung charakteristische Dublett des anomeren H-1'-Protons in allen PMR-Spektren (D_2O, zwischen 6,08 und 6,11 ppm). Die PMR-Spektren in DMSO-d_6 zeigen keine C-6-NH_2-Aminoprotonen mehr, die man bei Adenosinen um etwa δ = 6,4 ppm in Resonanz findet. Die Shifts der 5'-Methylenprotonen stufen sich innerhalb der 6'-Inosincarbonsäurederivate in der von den entsprechenden Adenosinen (in Klammern) bekannten Weise ab : Nitril δ = 3,12 ppm (3,16 ppm), Methylester δ = 2,96 ppm (2,96 ppm) und Amid δ = 2,84 ppm (2,82 ppm). Die an Adenosinen ausführlich studierten Einflüsse von 5'-unpolaren, polaren und ionisierbaren Gruppen auf die Shiftdifferenzen der Purinprotonen [70] werden analog bei den Inosinen beobachtet. Sind nur polarisierende Einflüsse wichtig, bleiben die $\Delta\delta$-Werte gering (Nitril 0,07 ppm, Ester 0,05 ppm), kommt die Fähigkeit, inter- und intramolekulare H-Brücken auszubilden, hinzu, wachsen die Shiftdifferenzen an (Inosin 0,12 ppm, Amid 0,21 ppm), liegt schließlich eine anionische Gruppe vor (5'-Inosincarbonsäure bei pD 7,0; $\Delta\delta$ = 0,30 ppm), ist der Abstand zwischen H-8 und H-2-Signal wegen der starken $COO^-\cdots$H-8-Wechselwirkung maximal. Eine bei den homologen Nucleosicarbonsäuren rasch auftretende und bislang kaum beachtete Besonderheit liegt darin, daß in neutraler

Lösung (D_2O) die Signalintensität stark verringert ist [72] (H-8 im PMR-Spektrum der 5'-Inosincarbonsäure liegt außerdem als Dublett vor; J = 0,8 Hz). Schon bei Raumtemperatur muß man hier, wie bei 5'- und 6'-Adenosincarbonsäure (nicht dagegen bei 7'-Adenosincarbonsäure [72]), mit einem H-D-Austausch rechnen, wogegen die Reaktion an Purinen normalerweise erst beim Erhitzen meßbar wird. Diese Beobachtung wird weiter bestätigt, wenn man 6'-Inosincarbonsäurenitril zwei Tage bei Raumtemperatur in D_2O stehen läßt, dann das Lösungsmittel abzieht und sofort in DMSO-d_6 aufnimmt. Im DMSO-PMR-Spektrum findet man für H-2 nur mehr ein sehr schwaches Signal.

O^2,5'-Cyclopyrimidinnucleoside

Die O^2,5'-Cycloverbindungen des Thymidins (O^2,5'-Cyclothymidin, O^2,5'-Cyclo-3'-O-acetylthymidin) und des Uridins (O^2,5'-Cyclo-2',3'-isopropylidenuridin) sind bekannt [40,73,74]. Die in dieser Arbeit dargestellten O^2,5'-Cyclopyrimidine, O^2,5'-Cyclo-2',3'-isopropylidenuridin (λ_{max} = 238 nm), $O^2$5'-Cyclothymidin und O^2,5'-Cyclo-3'-O-acetylthymidin (jeweils λ_{max} = 248) sind aufgrund der UV-Daten mit den in der Literatur beschriebenen Verbindungen identisch. In alkalischer Lösung verschieben sich die Extinktionsmaxima als Folge der zeitabhängig aufspaltenden O^2,5'-Bindung bathochrom zu den für Uridin (λ_{max} = 261 nm) und Thymidin (λ_{max} = 266 nm) erwarteten Wellenlängen. Fährt man den Wellenlängenbereich zwischen 220 und 350 nm zu verschiedenen Zeiten nach NaOH-Zugabe ab, erhält man für jedes Cyclonucleosid Kurvenscharen , die zwei isosbestische Punkte aufweisen; die O^2,5'-Bindungstrennung verläuft also einheitlich und ohne Folgereaktionen. Dieses unverwechselbare Verhalten erlaubt es, Neubildung von Cyclopyrimidinen (z.B. bei deren Synthese) oder deren Verschwinden (6'-Pyrimidincarbonsäurenitrile aus O^2,5'-Cyclonucleosiden) zu kontrollieren. Die parachinonähnliche Struktur des Pyrimidinrings in den Cyclonucleosiden hat nicht nur eine drastische Veränderung des Chromophors zur Folge, sondern auch die C=O-Valenzschwingungen im IR sind zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Die wegen der

Verbrückung fixierte Konformation ist für intensive Banden im CD-Spektrum verantwortlich (S. unten).

Uridine und Thymidine

Die synthetisierten 6'-Uridincarbonsäurederivate (λ_{max} = 258/259 nm) und 6'-Thymidincarbonsäurederivate (λ_{max} = 265 nm) zeigen in neutraler, wässriger Lösung die erwarteten UV-Spektren. Für das Verhalten der Pyrimidincarbonsäurenitrile in alkalischer Lösung gilt analog das für 6'-Adenosincarbonsäurenitrile Gesagte. Unabhängig vom Zustand der Zuckerhydroxylgruppen kommt es zur Abspaltung der Pyrimidinbase mit der in 2.1.2.1. diskutierten Besonderheit bei 5'-Cyanothymidin. Da die alkalische Eliminierung der Nucleobase bei 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrilen, wie wir annehmen müssen, generell auftritt, ist damit ein entscheidendes Kriterium für den Strukturbeweis gefunden. Zusammen mit der C≡N-Valenzschwingung im IR (2240 cm^{-1}) und dem Dublett des anomeren H-1'-Protons im PMR-Spektrum ist die Struktur aller 6'-Pyrimidinnucleosidcarbonsäurenitrile zweifelsfrei. Die chemische Verschiebung der C-5'-Methylenprotonen der Nitrile ist nur abhängig von der Nachbarschaft und Art der Base, denn mit 3,11 ppm (5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenuridin), 3,11 ppm (5'-Desoxy-5'-cyano-3'-O-acetylthymidin) und 3,02 ppm (5'-Desoxy-5'-cyanothymidin) liegen die Resonanzen im gleichen Bereich wie die des 5'-Desoxy-5'-cyanoadenosins (3,16 ppm) und -Inosins (3,12 ppm). Wegen der verschiedenen Lösungsmittel, in denen die PMR-Spektren aufgenommen sind (D_2O, DMF-d_7, DMSO-d_6 und $CDCl_3$) und der damit verbundenen unterschiedlichen Lösungsmitteleffekte lassen sich die hier gewonnenen PMR-Daten der H-5, H-6 und C-5-CH_3-Protonen nicht ohne weiteres zu einer Konformationsanalyse verwenden [71]. Das aus Thymidincarbonsäurenitril (FD-MS: 251 (M^+, 100 %)) durch Methanolyse entstehende neue Nucleosid ist in allen Linien seines FD-MS-Spektrums mit der Zusammensetzung des 6'-Thymidincarbonsäuremethylesters vereinbar. Außer des M^+-Signals (284, 100 %) und dessen Trabanten ($(M+H)^+$ 285, 26 % ; $(M+2H)^+$ 286, 6 %) findet man das beweiskräftige Signal 159 ($(M-Thymin)^+$, 12 %). Danach muß die Reaktion erwartungsgemäß am Zuckerrest eingetreten sein; UV-Daten (λ_{max} = 266 nm),

PMR-Signale des H-1' bei 6,30 ppm (Dublett) und der Estermethylgruppe (δ = 3,66 ppm) sowie die Ester-C=O-Valenzschwingung bei 1740 cm^{-1} ergeben ein geschlossenes spektroskopisches Bild des 6'-Thymidincarbonsäuremethylesters. Sein Verseifungsprodukt gibt sich im UV (λ_{max} = 265 nm) und auf dem Cellulosedünnschichtchromatogramm (Butanol/Wasser, R_f = 0) einwandfrei als 6'-Thymidincarbonsäure zu erkennen.

Das chromatografische Verhalten entsprechender Nucleosidcarbonsäurederivate der Adenosin-, Uridin- und Thymidinreihe unterscheidet sich kaum voneinander. Für die R_f-Werte von Nucleosidcarbonsäurederivaten erhält man auf der Kieselgeldünnschicht mit rein organischen Fließmitteln und auf der Cellulosedünnschicht mit wasserhaltigen Fließmitteln jeweils dieselbe Reihenfolge: Geschützte 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrile > 6'-Nucleosidcarbonsäuremethylester > 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrile > 6'-Nucleosidcarbonsäureamide > 5'-homologe Nucleosidcarbonsäuren (R_f = 0; unabhängig von der 5'-C-Kettenlänge). Inosincarbonsäurederivate werden aufgrund der C-6-OH-Gruppe offenbar fester an das jeweilige Sorbens gebunden, da die R_f-Werte generell kleiner sind als in der Adenosinreihe; die genannte Abstufung bleibt jedoch erhalten. Als Besonderheit sind die R_f-Werte von ungeschütztem 6'-Nucleosidcarbonsäurenitril und entsprechender Nucleobase auf Kieselgel in allen getesteten Fließmitteln identisch, nur auf Cellulose in Butanol/Wasser sind Base und Nitril chromatografisch unterscheidbar. Die O^2,5'-Cyclostruktur in Cyclopyrimidinen hat - gegenüber den unverbrückten Nucleosiden - nicht nur kleinere R_f-Werte, sondern auch verringerte Löslichkeit zur Folge.

2.1.5.2. Circulardichroismus-(CD)-Spektroskopie und Konformation

In Nucleinsäuren und ihren monomeren Komponenten spielt neben der Primärstuktur die Molekülkonformation - relative räumliche Anordnung von Base, Zucker und Phosphat oder anderen Substituenten - eine funktionell entscheidende Rolle. CD-Spektroskopie ist ein wertvolles Instrument für Konformationsuntersuchungen an Nucleosiden, Mono- und Oligonucleotiden. Ähnlich wie bei der PMR-Spektroskopie können verdünnte, wässrige Lösungen bei physiologischen Konzentrations-, Ionenstärke- und pH-Verhältnissen studiert werden. Vorzeichen und Größe der Cottoneffekte von Purin- und Pyrimidinnucleosiden werden aufgrund empirischer Methoden [75] oder theoretisch-quantenmechanischer Ansätze [76,77] mit dem Zucker-Base-Torsionswinkel Φ_{CN} in Beziehung gebracht. An Purin- und Pyrimidinnucleosiden mit raumerfüllenden Substituenten an der 8- bzw. 6-Position und der damit erzwungenen Abweichungen von der bevorzugten anti-Konformation ($-75^{\circ} < \Phi_{CN} < 15^{\circ}$, Abb. 19) wird gezeigt, daß gegenüber der unsubstituierten Verbindung eine Vorzeichenumkehr der langwelligen Bande eintritt [78]. Die CD-Spektren verschiedener anomerer Pentofuranoside sind gut untersucht [79,80], der Einfluß von 5'-Substituenten auf die Konformation wird jedoch erst in letzter Zeit zunehmend beachtet [45]. Wie eine Analyse der CD-Spektren von Adenosinen mit verschiedenen 5'-Substituenten zeigt, gibt es auch innerhalb der zuckermodifizierten Nucleoside Beispiele von sehr geringen molaren Elliptizitäten und von Vorzeichenumkehr bei der langwelligen Bande. Dafür muß aber nicht notwendigerweise eine Drehung der unsubstituierten Base in den syn-Bereich ($105^{\circ} < \Phi_{CN} < -160^{\circ}$; Abb. 19) verantwortlich sein, wie verschiedene, teils halbempirische Rechnungen zeigen. CD-Daten allein können deshalb nicht zur Beschreibung der Konformation eines einzelnen Nucleosids ausreichen. Die PMR-Spektroskopie liefert die ergänzenden Informationen, wenn die Abstände der Nucleosid-Basenprotonensignale voneinander (Purinnucleoside) bzw. der Abstand zwischen den entsprechenden Signalen in Spektren der Nucleoside und denen der

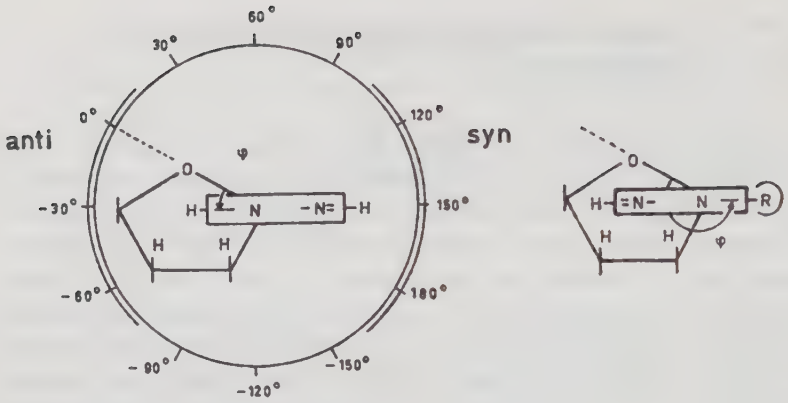


Abb. 19 : Molekülkonformation von Nucleosiden

Nucleobase (Pyrimidinnucleoside) korreliert werden mit der Art des 5'-Substituenten [70,71]. Die in dieser Arbeit neu dargestellten, 5'-modifizierten Nucleoside sind geeignet, den zwischen der Natur des 5'-Substituenten und der Konformation hergestellten Zusammenhang [45] weiter zu belegen.

Als 6'-Nucleosidcarbonsäurederivate weisen die neuen Adenosinnucleoside polare, π-elektronenhaltige 5'-Substituenten auf, die als Donor (Amid, Säure) oder auch als Akzeptor (C=O, Carboxylat) von H-Brücken in Betracht kommen. 6'-Adenosincarbonsäure liegt in neutraler Lösung als Monoanion vor, wie auch 5'- und 7'-Adenosincarbonsäure. Das CD-Spektrum der 6'-Säure ist in weiten Bereichen nach Lage und Intensität der Banden nur wenig von dem der 7'-Säure verschieden (Abb. 20). Die langwelligen Cottoneffekte von 6'-Adenosincarbonsäure ($[\theta]_{260} = -2500$)[+] und 7'-Adenosincarbonsäure ($[\theta]_{258} = -2600$) erreichen nicht ganz den Wert des Adenosins ($[\theta]_{262} = -3000$); deutlich

[+]Molare Elliptizität $[\theta]$ hat die Dimension Grad · cm^2 · $dmol^{-1}$; sie ist hier und bei allen folgenden Angaben zu ergänzen.

Tabelle 1 : CD-Daten von 5'-modifizierten Nucleosiden in Wasser bei pH = 6,5 ± 0,5, wenn nichts anderes angegeben; Wellenlängenangaben in nm, Elliptizitäten $[\theta]$ in Grad·cm^2·dmol^{-1}.

Nucleosid	λ_{max}	λ	$[\theta]$	λ	$[\theta]$	λ	$[\theta]$	λ	$[\theta]$
5'-Adenosincarbonsäure [19]	258	260:	- 4000	228:	1600	215:	6100		
6'-Adenosincarbonsäure	258	260:	- 2500			215:	- 1700	198:	2600
6'-Adenosincarbonsäure (pH 2)		250:	- 1700	225:	3400	210:	- 6200	198:	2800
6'-Adenosincarbonsäure (pH 12)		265:	- 2600	220:	- 1800				
7'-Adenosincarbonsäure [16]	258	258:	- 2600	230:	600	215:	- 1500		
6-Chlor-2',3'-isopropyliden-purinribosid	264	272:	- 2000	220:	3900	210:	- 1700		
6-Chlorpurinribosid	264	273:	- 2500	220:	4200	210:	- 9000	200:	2700
6'-Adenosincarbonsäuremethyl-ester	258/207	265:	- 1200	235:	850	215:	- 1400	205:	4100
6'-Adenosincarbonsäureamid	258	265:	- 1300	225:	3000	208:	8400		
5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-iso-propylidenadenosin	258/207	270:	- 400	225:	3600				
5'-Desoxy-5'-cyanoadenosin	258/207	265:	- 700	225:	900			195:	2300
5'-Thymidincarbonsäuremethylester [23]	265	275:	2800	243:	- 1200	215:	- 2800	195:	10300
5'-Desoxy-5'-cyanothymidin	265/205	280:	500	250:	- 2000	213:	- 1600	195:	3400
5'-Desoxy-5'-cyano-3'-O-acetyl-thymidin	265/206	275:	2050	245:	- 2450	215:	- 2750	194:	4800

Fortsetzung Tabelle 1

Nucleoside	λ_{max}	λ	$[\theta]$	λ	$[\theta]$	λ	$[\theta]$	λ	$[\theta]$
6-Methyluridin [82]		270: -	500	250:	1050	215: -	10000		
5'-Desoxy-5'-cyanothymidin	265/205	280:	500	250: -	2000	213: -	1600		
6'-Thymidincarbonsäuremethylester	265	275:	2800	243: -	1200	215: -	2800	195:	10300
6'-Thymidincarbonsäure	265	270:	5700	237: -	1400	215: -	900	200:	4100
6'-Thymidincarbonsäure (pH 2)		273:	3400	243: -	900	230:	500	220: -	500
6'-Thymidincarbonsäure (pH 12)		267:	5800	231: -	3650	215: -	5250		
5'-Thymidincarbonsäure [20]	266	274:	2900	242: -	4500	207:	8900	197:	10800
5'-Thymidincarbonsäure (pH 2)		276:	1500	244: -	4100	204:	7800		
5'-Thymidincarbonsäure (pH 12)		268:	6100	232: -	5200				
5'-Desoxy-5'-cyanouridin	260/205	269:	6800	238: -	2500	216: -	3700	197:	2800
5'-Uridinnitrat [80]	260	270:	7100	238: -	3100	212: -	3300	198:	4500
5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenuridin	260/205	262:	4700	230:	1200	210: -	2100		
5'-Uridincarbonsäure [20]	261/205	270:	4300	242: -	4400			203:	6200
5'-Uridincarbonsäure-ethylester [23]	260/206	270:	7800	240: -	6500			198:	12200
O^2,5'-Cyclo-2',3'-isopropylidenuridin	238	233: -	22300			195:	47800		
O^2,2'-Cyclouridin [41]	250/223	270: -	1000	242:	12000	217: -	7500		
O^2,5'-Cyclo-3'-O-acetylthymidin	248			235: -	22500			195:	59000

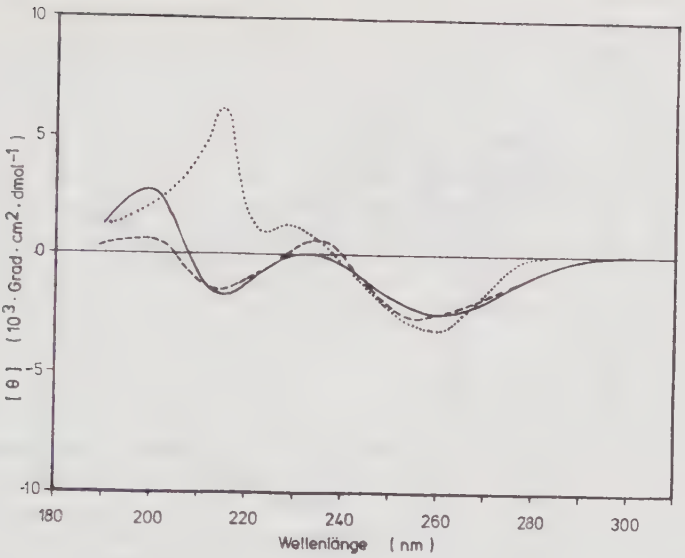


Abb. 20 : CD-Spektren von 5'-Adenosincarbonsäure (····), 6'-Adenosincarbonsäure (——) und 7'-Adenosincarbonsäure (- - -).

intensiver ist die Bande der 5'-Säure ($[\theta]_{260}$ = - 4000). Im zweiten Bandenbereich bei 215 nm nimmt das CD-Spektrum der 5'-Adenosincarbonsäure einen hohen positiven Wert an, wo die längerkettigen Säuren negative Cottoneffekte mittlerer Intensität aufweisen. In alkalischer Lösung ändert sich das CD-Spektrum von 6'-Adenosincarbonsäure nur geringfügig in der Lage bei fast unveränderten Intensitäten. Da schon in neutraler Lösung das Monoanion vorliegt, kann Gegenwart von Alkali nur einen unspezifischen Einfluß (etwa durch Erhöhung der Ionenstärke) auf die elektronischen Verhältnisse im Nucleosid und dessen CD-Spektrum haben. Die Protonierung des Carboxylatanions und der N^6-Aminogruppe in saurer Lösung bewirkt dagegen drastische Verschiebungen im CD-Spektrum, dessen kurzwelliger Teil (230 - 190 nm) auffallende Ähnlichkeit zum Spektrum des 6-Chlorpurinribosids (in neutraler Lösung) aufweist. Die langwellige Bande der 6'-Adenosincarbonsäure ist weniger negativ ($[\theta]_{250}$ = - 1700) und liegt bei 250 nm. Auch die CD-Spektren von 5'- und 6'-Adenosincarbonsäure sind in saurer Lösung stark verändert.

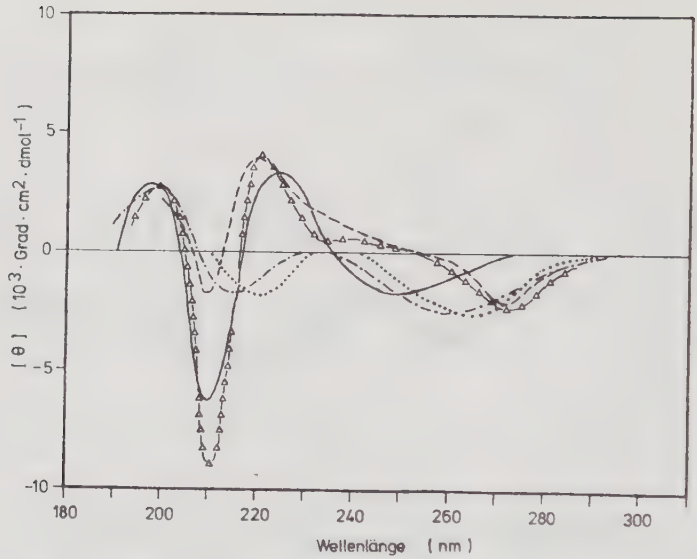


Abb. 21 : CD-Spektren von 6'-Adenosincarbonsäure bei pH 2 (——), pH 7 (-·-) und pH 12 (···); 6-Chlor-2',3'-isopropylidenpurinribosid (- -) und 6-Chlorpurinribosid (△-△)

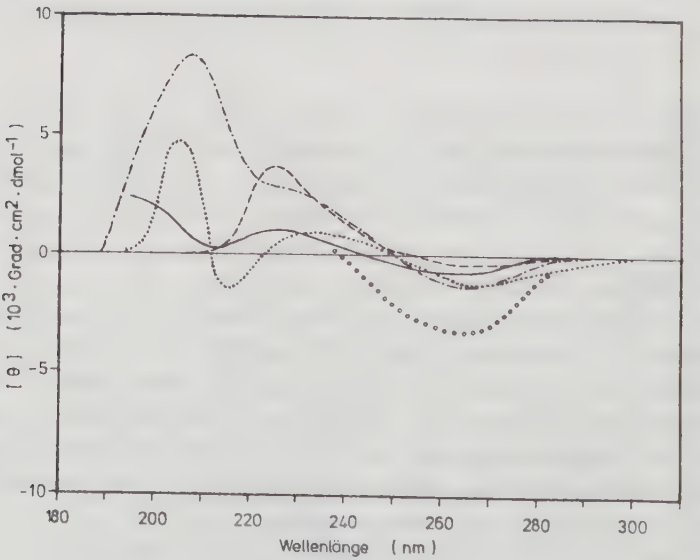


Abb. 22 : CD-Spektren von 5'-Desoxy-5'-cyanoadenosin (——), 5'-Desoxy-5-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin (- -), 6'-Adenosincarbonsäureamid (-··-), 6'-Adenosincarbonsäuremethylester (···) und Adenosin (ooo).

Die langwelligen Cottoneffekte der 6'-Adenosincarbonsäureester und -Amide sind zwar negativ wie für Adenosine überwiegend gültig, aber bleiben mit der intensivsten langwelligen Bande weit unter der Elliptizität des Adenosins (Abb. 22). Das Spektrum des 6'-Methylesters weist große Ähnlichkeit mit dem des Amids auf. Außer nahezu identischen Elliptizitäten bei langer Wellenlänge sind die Cottoneffekte im kurzwelligen Teil des Spektrums jeweils positiv und vergleichsweise intensiv (Tabelle 1). Die Effekte von 6'-Adenosincarbonsäurenitril und seiner 2',3'-Isopropylidenverbindung bei 205 nm sind dagegen null bzw. nur wenig von null verschieden. Die langwelligen Elliptizitäten der 5'-Cyanoadenosine gehören mit $[\theta]_{265} = -700$ und $[\theta]_{270} = -400$ (Isopropylidenverbindung) zu den geringsten, die bisher von 5'-modifizierten Adenosinen bekannt sind. Nur 5'-Desoxy-5'-azidoadenosin ($[\theta]_{271} = -600$), 5'-Desoxy-5'-bromadenosin ($[\theta]_{275} = 700$) [45], 5'-Adenosincarbonsäuremethylester ($[\theta]_{262} = -1200$) und 5'-Adenosinnitrat [79,80] ($[\theta]_{290} = 300$) zeigen ihrem Betrage nach ähnlich geringe CD-Effekte im langewelligen Bereich. Beide Adenosincarbonsäurenitrile haben im mittleren Teil des Spektrums bei 225 nm eine Bande gemeinsam, die der Isopropylidenverbindung ist allerdings um den Faktor 4 intensiver (Abb. 22). Die molaren Elliptizitäten der Nitrile bei 265 bzw. 270 nm unterscheiden sich zwar noch im Betrage, wohl bedingt durch eine Beeinflussung der Zuckerkonformation durch die Isopropylidengruppe, wichtiger ist aber, daß beide Werte absolut gesehen sehr niedrig liegen. Adenosinderivate mit derart geringen Cottoneffekten im langwelligen Teil des Spektrums erlauben es, eine Skala zu interpolieren, die molare Elliptizitäten mit dem Glykosidtorsionswinkel Φ_{CN} verknüpft [45]. 5'-AMP mit $[\theta]_{259} = -4100$ und einem durch Röngenstrukturanalyse und PMR-untersuchungen gesicherten Torsionswinkel $\Phi_{CN} = -40^{\circ}$ ist Fixpunkt der Skala; 6'-Adenosincarbonsäurenitril, -Amid und -Methylester ermöglichen eine Komplettierung der Skala in Richtung $\Phi_{CN} = 0^{\circ}$. Die langwellige Bande des Adenosincarbonsäureanions ist wesentlich intensiver als die der Derivate und damit Adenosin-ähnlicher. Das bestätigt aber nur die bei 5'-AMP und 5'-Adenosincarbonsäure und anderen Adenosinen mit 5'-ionisierten Substituenten gemachte Beobachtung, daß ionische

5'-Funktionen CD-Spektren nicht signifikant beeinflussen [45].

Die CD-Spektren der Thymidine weisen im langwelligen Teil die charakteristischen positiven Cottoneffekte auf. Wesentlich kleinere Elliptizitäten als Thymidin ($[\theta]_{272}$ = 4000) zeigen 5'-Thymidincarbonsäuremethylester, 5'-Desoxy-5'-cyanothymidin, 5'-Desoxy-5'cyano-3'-O-acetylthymidin und - als Sonderfall - das Thymidinanaloge 6-Methyluridin. 6'-Thymidincarbonsäuremethylester, 6'- und 5'-Thymidincarbonsäure (Abb. 23) dagegen erreichen oder übertreffen die langwellige Elliptizität des Thymidins. Wie in der Adenosinreihe beobachtet, sind die langwelligen Elliptizitäten der Nitrile auch in der Thymidinreihe dem Betrage nach kleiner als die der natürlichen Nucleoside. Extrem niedrig ist die langwellige Elliptizität des 5'-Cyano-

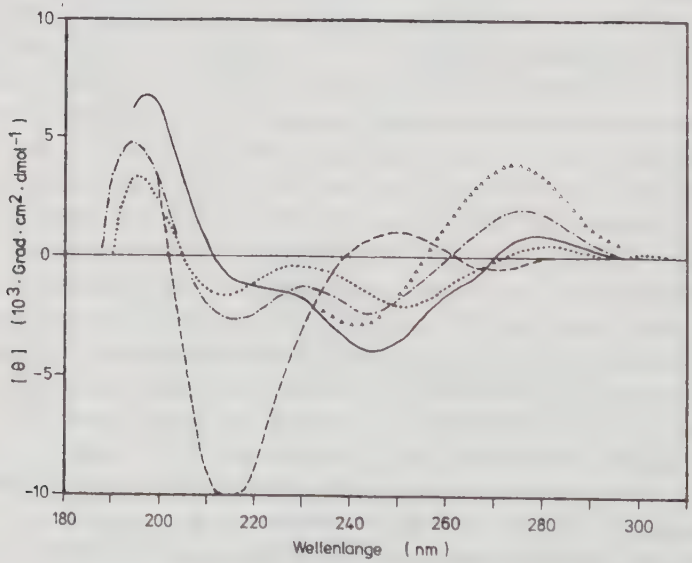


Abb. 23 : CD-Spektren von 5'-Thymidincarbonsäuremethylester (——), 6-Methyluridin (- -), 5'-Desoxy-5'-cyanothymidin (•••), 5'-Desoxy-5'-cyano-3'-O-acetylthymidin (-•-) und 3'-O-Acetylthymidin (▲ ▲ ▲).

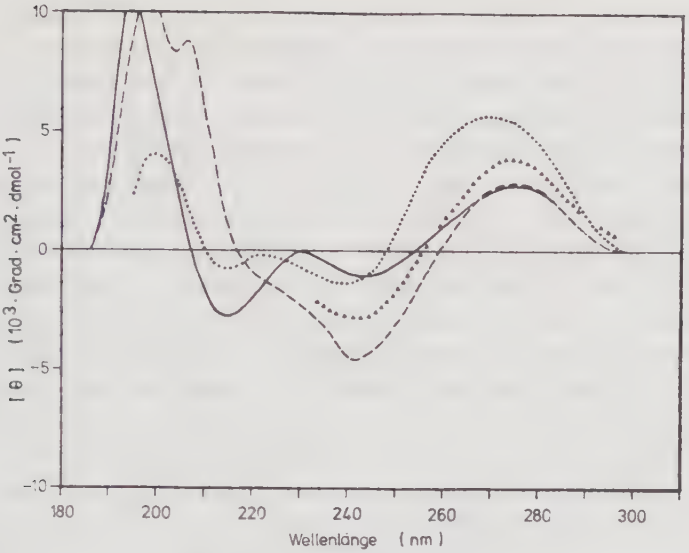


Abb. 24 : CD-Spektren von Thymidin-6'-carbonsäuremethylester (——), 6'-Thymidincarbonsäure (•••), 5'-Thymidincarbonsäure (- -) und 3'-O-Acetylthymidin (▲▲).

thymidins mit $[\theta]_{280}$ = 500. In Umkehrung der Verhältnisse bei den Cyanoadenosinen wird hier die intensivere Bande vom zuckersubstituierten Nitril hervorgerufen (5'-Cyano-3'-O-acetylthymidin: $[\theta]_{275}$ = 2050). Der erhebliche Unterschied überrascht, weil Thymidin und 3'-O-Acetylthymidin nahzu identische CD-Spektren besitzen. Es ist nicht auszuschließen, daß 5'-Cyanofunktion und 3'-O-Acetylgruppe miteinander in Dipol-Dipol-Wechselwirkung stehen. Der polarisierende Einfluß der Cyanogruppe auf die Base würde in diesem Fall abnehmen und ein dem Thymidin ähnlicheres Spektrum begünstigen. Durch diese C-5'-Thymin-Wechselwirkung erhält 5'-Cyanothymidin ein dem 6-Methyluridin bezüglich der Nullachse beinahe spiegelbildliches CD-Spektrum. Da 6-Methyluridin aus sterischen Gründen in der syn-Konformation vorliegt, ist das unterschiedliche Vorzeichen der CD-Banden jedoch verständlich.

Die Abstufung der langwelligen Cottoneffekte innerhalb der Nucleosidcarbonsäurederivate des 6'-Typs ist bei Adenosinen und Thymidinen identisch. Die langwellige molare Elliptizität des Methylesters liegt auch hier zwischen der des Nitrils und der Säure (Tabelle 1). Bezieht man die 5'-Thymidincarbonsäure und deren Methylester in die Betrachtung mit ein, so lassen sich weitere erstaunliche Parallelen zwischen den CD-Spektren von Adenin- und Thymidinnucleosiden feststellen. Wie beim entsprechenden Adenosincarbonsäureester ist der langwellige Cottoneffekt des 5'-Thymidincarbonsäuremethylesters gering ($[\theta]_{277}$ = 1000) und in der gleichen Größenordung, aber mit der doppelten Elliptizität des ungeschützten Nitrils der 6'-Thymidincarbonsäure ($[\theta]_{280}$ = 500). Die CD-Kurven von 5'-Thymidincarbonsäure und 6'-Thymidincarbonsäuremethylester fallen auf durch weitgehende Deckungsgleichheit bei sehr kurzer und langer Wellenlänge. Auch bei den entsprechenden Adenosinen 5'-Adenosincarbonsäure und 6'-Adenosincarbonsäuremethylester weisen die CD-Kurven zwischen 200 und 250 nm starke Ähnlichkeiten auf (Abb. 20 und Abb. 22).

Etwas weniger einheitlich in der Abhängigkeit der Cottoneffekte vom 5'-Substituenten präsentieren sich die CD-Spektren der Uridincarbonsäurederivate (Abb. 25). Die langwelligen molaren Elliptizitäten von 5'-Cyanouridinen und 5'-Uridincarbonsäure und -Methylester sind positiv, aber (auch) ausnahmslos kleiner als die des unsubstituierten Nucleosids (Uridin: $[\theta]_{267}$ = 9200)[77]. Betrachtet man die Elliptizitätsabnahme im langwelligen Bereich, wenn man statt des 2',3'-ungeschützten ($[\theta]_{262}$ = 4700) das 5'-Desoxy-5'cyano-2',3'-isopropylidenuridin ($[\theta]_{269}$= 6800) vor sich hat, so fällt auf, daß sich hier die Isopropylidenschutzgruppe in dieselbe Richtung auswirkt, wie bei den entsprechenden Cyanoadenosinen. Im Gegensatz zu den Cyanothymidinen, wo eine 3'-O-Acetylfunktion eher eine nivellierende Wirkung hat, scheint die 2',3'-Isopropylidengruppe die Auswirkungen einer 5'-Cyanogruppe auf die Konformation und damit das CD-Spektrum zu verstärken; der Mechanismus ist noch unklar, aber dürfte am ehesten mit der zuckerfixierenden Natur des Isopropylidenringes gegenüber einer einfachen Acetylgruppe zu tun

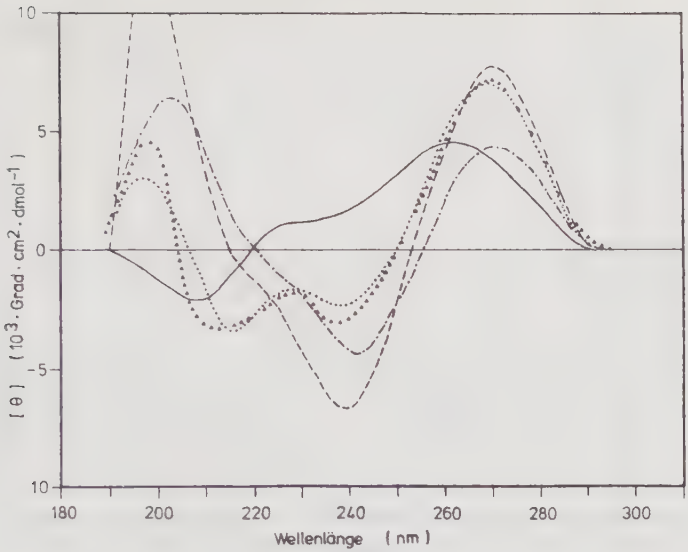


Abb. 25 : CD-Spektren von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenuridin (——), 5'-Uridincarbonsäure (-·-), 5'-Uridincarbonsäureethylester (- -), 5'-Desoxy-5'-cyanouridin (···) und 5'-Uridinnitrat [80] (▲▲▲).

haben. Nicht in das von der Thymidin- und Adenosinreihe vertraute Muster paßt der relativ niedrige Cottoneffekt der 5'-Uridincarbonsäure ($[\theta]_{270}$ = 4300), wohl bedingt durch eine H-Brücke zwischen Carboxylatanion und H-6 [71]. Die fast vollständige Deckungsgleichheit der CD-Spektren von 5'-Cyanouridin und 5'-Uridinnitrat [79,80] beweist, daß primär die Polarität des 5'-Substituenten (NO_2- und CN-Gruppe sind in der selben Richtung polarisiert) entscheidend ist für seine Fähigkeit, mit der Base in Wechselwirkung zu treten, und nicht die exakte Struktur des Substituenten.

Die CD-Spektren der im Laufe der Arbeit gewonnenen O^2,5'-Cyclopyrimidinnucleosiden sind in Abb. 26 dargestellt und entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten [76,81]. Im Vergleich zu den unverbrückten Nucleosiden sind zum einen die vielfach größeren molaren Elliptizitäten auffällig, die eine einzige fixierte Konformation widerspiegeln und nicht wie bei den 'offenen' Nucleosiden eine Population verschiedener Koformerer.

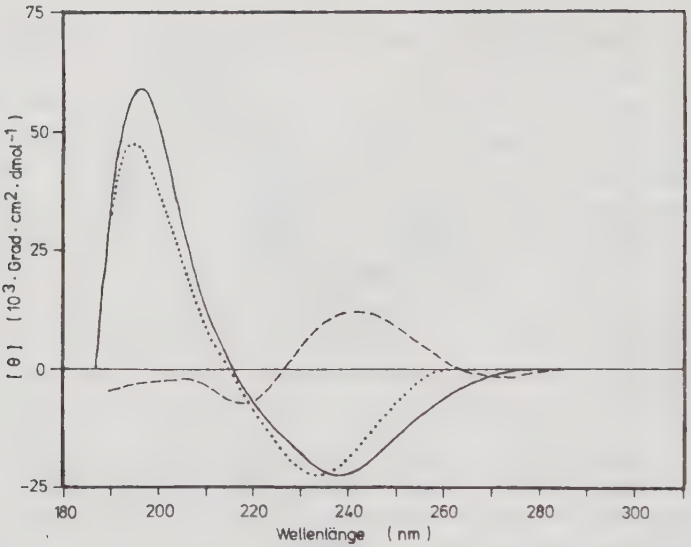


Abb. 26 : CD-Spektren von O^2,5'-Cyclo-3'-O-acetylthymidin (——), O^2,5'-Cyclo-2',3'-isopropylidenuridin (•••) und O^2,2'-Cyclouridin (- -).

Zum anderen beobachtet man eine Vorzeichenumkehr bei den langwelligen Banden der O^2,5'-Cyclonucleoside gegenüber den normalen Nucleosiden, bedingt durch Fixierung der Base in anti-Stellung. Beim O^2,2'-Cyclouridin registriert man trotz der geringen Winkeländerung von Φ_{CN} bereits wieder Uridin-typische, positive Cottoneffekte im langwelligen Spektrumsteil. Das CD-Verhalten der Cyclonucleoside kann, zusammen mit der raschen Verringerung der molaren Elliptizitäten in alkalischer Lösung (Spaltung der O^2,5'-Bindung) als unabhängiger Strukturbeweis angesehen werden.

Die vielfältigen Parallelen und Gesetzmäßigkeiten, die in den CD-Spektren entsprechender Nucleosidcarbonsäurederivate der Adenosin-, Thymidin- und Uridinreihe sichtbar werden, bekräftigen an einer neuen Gruppe von Verbindungen die Vorstellung [45], daß der Wechselwirkung zwischen einem bestimmten 5'-Substituenten und der Nucleobase unabhängig von der Art der Base ein

einheitlicher Mechanismus zugrunde liegt, der letztlich für die Äquivalenz von Purin- und Pyrimidinbausteinen in den Nucleinsäuren und bei deren Funktionen verantwortlich ist.

2.2. 5'-Homologe Adenosincarbonsäuren in Enzymsystemen

Über die biochemischen Eigenschaften von Nucleosiden und Nucleotiden entscheidet nicht nur deren Primärstruktur, sondern auch ihre Molekülkonformation, die relative Anordnung von Base, Zucker und Phosphat oder anderer Substituenten. So kann bei Nucleotidumsetzenden Enzymen die Strukturspezifität gegenüber der Konformationsspezifität in den Hintergrund treten, wie kinetische Untersuchungen an Ribonucleotidreduktase aus E.coli beweisen: Alle Nucleosiddiphosphate mit unnatürlichen Basen oder Basensubstituenten werden als Substrate toleriert, solange die anti-Konformation gewährleistet ist; erzwingen aber raumerfüllende Basensubstituenten die syn-Konformation, sind die Nucleosiddiphosphate als Substrate inaktiv [83].
Enzymstudien mit den homologen 5'-Adenosincarbonsäuren (Typ I, n = 0, 1, 2; Abb. 1) als AMP-analoge Substratmodelle müssen daher strukturelle und konformative Aspekte berücksichtigen. Alle Carbonsäuren dieses Typs gleichen dem 5'-AMP bei physiologischen pH-Werten in der monoanionischen Struktur der exocyclischen 5'-Substituenten. Mit der Verlängerung der 5'-C-Kette gegenüber Adenosinuronsäure um eine (6'-Adenosincarbonsäure) oder zwei CH_2-Gruppen (7'-Adenosincarbonsäure) verändert sich der relative Abstand des Monoanions zur Base und zum Zuckerrest. Diese strukturellen Veränderungen haben, wie PMR- und CD-Daten belegen (Vgl. 2.1.5.1. und 2.1.5.2.), anti-Konformationen unterschiedlicher Flexibilität zur Folge, Die Ergebnisse der unten beschriebenen kinetischen Experimente werden daher auch den spektralen Daten gegenübergestellt.

2.2.1. N^6-Desaminierungsreaktionen

2.2.1.1. Eigenschaften und physiologische Rolle von AMP-Desaminase

AMP-Desaminase (AMP-Aminohydrolase, E.C.3.5.4.6) katalysiert die Umwandlung von 5'-AMP zu IMP und Ammoniak und zeigt eine strenge Spezifität für dieses Substrat [84]. Obwohl man sie in einer Vielzahl von tierischen Geweben findet, ist ihre physiologische Rolle noch unklar. Wahrscheinlich dient sie nicht dem katabolen Stoffwechsel. Während das Desaminierungsprodukt IMP nur als seltener Bestandteil von RNA und als Primärprodukt der Purinbiosynthese wichtig ist, kommt dem Substrat 5'-AMP als einer Regelgröße der energy charge besondere Bedeutung zu [4]. Zwischen AMP-Desaminaseaktivität und Größe der energy charge besteht ein Regelmechanismus, dessen Charakteristik für die Isoenzyme aus verschiedenen Geweben eines Organismus unterschiedlich ist. So können die immunologisch verschiedenen AMP-Desaminase aus Herzmuskel, Skelettmuskulatur und Leber von Ratte bzw. Kaninchen auch regulatorisch klar unterschieden werden [85].Die kinetischen Studien an den homogenen Enzymen aus Rattenmuskel [86-89] und Kalbshirn [90] und dem bereits kristallin erhaltenen Enzym aus Kaninchenmuskel [91] belegen ein weitgehend ähnliches Verhalten gegenüber Nucleosidtriphosphaten, die keine Substrate sind, aber die Enzymaktivität entweder stimulieren (hohe Konzentrationen von ATP) oder hemmen (GTP)[92]. Da sowohl ATP als auch GTP als Substrate an Purinnucleotidumwandlungen beteiligt sind, liegt es nahe, dafür ein selbstregulierendes System mit AMP-Desaminase als Schlüsselenzym anzunehmen [93] (Abb. 27). ATP aktiviert die Umwandlung von AMP zu IMP (1) und ist ebenfalls an der Synthese von GMP aus XMP (2) erforderlich; ATP fungiert als Effektor und als Substrat bei der Synthese der Guaninnucleotide. Umgekehrt inhibiert GTP die AMP-Desaminierung zu IMP (3), weiter ist es als Substrat an der Synthese des AMP aus IMP via Adenylosuccinat beteiligt (4). Damit wirkt GTP als Inhibitor und als Substrat an der Bildung von Adeninnucleotiden mit. Die antagonistische Regulation durch Inhibierung / Aktivierung der AMP-Desaminase gewährleistet ein balanciertes Ver-

hältnis der Purinnucleotide.

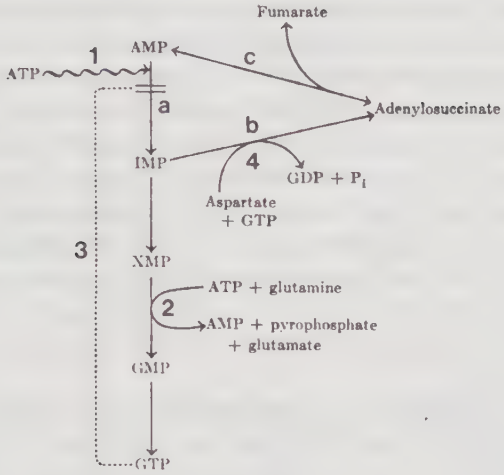


Abb. 27 : Purinnucleotidumwandlungen

Diese Vorstellungen von der physiologischen Funktion der Desaminase - Sicherung ausgewogener Purinnucleotidpools einerseits, Stabilisierung der energy charge durch veränderte Aktivitäten bei drohenden unphysiologischen Werten andererseits - geben einen Hinweis darauf, warum besonders hohe Aktivitäten in Skeletmuskulatur zu finden sind. In glykolyseaktiven, zellfreien Extrakten aus Rattenmuskel oszilliert der Purinnucleotidcyclus (Reaktionen a, b, c in Abb. 27) synchron zu Oszillationen der Glykolysezwischenprodukte und der ATP/ADP-Konzentrationsverhältnisse [94,95]; die Steuerung dieser Schwankungen wird der Phosphofructokinase zugeschrieben, die durch ATP inhibiert, durch AMP und Ammoniak aktiviert wird (Muskelarbeit und NH_3-Produktion sind proportional). Wahrscheinlich sorgt bei Muskelarbeit die Desaminasereaktion durch gesteigerte Bildung von Ammoniak dafür, daß Phosphofructokinase früher aktiviert wird und die ATP/ADP-

Konzentrationen mit geringer Amplitude um einen hohen Mittelwert schwanken [94]. Die Proportionalität von NH_3-Produktion und Muskelarbeit in vivo bestätigt die aus kinetischen Daten abgeleitete Interpretation. Die gravierenden Symptome, wie Krampf- und Schwächezustände nach Muskelarbeit bei Individuen mit AMP-Desaminasedefekt [96] legen darüber hinaus einen engen Zusammenhang zwischen kontraktilem System und AMP-Desamniase nahe. Wie durch Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeiten bewiesen, bildet Kaninchenmuskel-Desaminase stabile Komplexe mit schwerem Meromyosin oder dessen S-2-Fragment [97], von dem man annimmt, daß es die globulären ATPase-haltigen 'Köpfe' mit Actin in Kontakt bringt. Nach neuesten Befunden ist AMP-Desaminase mit einer spezifischen Region der A-Bande von Myofibrillen assoziiert[97].

Alle bislang beschriebenen AMP-Desaminasen benötigen K^+ als Aktivator, andere Kationen der Reihe Na^+, Li^+, NH_4^+ und Rb^+ können es in abnehmender Effizienz ersetzen [98]. Die inhibierende Wirkung von Chelatbildnern beruht auf der Komlexierung des Zn^{++}, das in nativem Enzym enthalten ist [99,100]; Zn^{++} kann gegen Co^{++}, Mn^{++} oder Fe^{++} unter Aktivitätseinbußen ausgetauscht werden. Für AMP-Desaminase aus Muskelgweben verschiedener Herkunft werden Molekulargewichte zwischen 240000 und 286000 angegeben [101]. SDS-Gelelektophorese und Analyse der tryptischen Fragmente belegen den Aufbau aus vier identischen Untereinheiten [102].

Genauere Vorstellungen über den molekularen Ablauf einer enzymkatalysierten Desaminierungsreaktion gibt es bisher nur für den Umsatz von Adenosin durch die einfacher gebaute Adenosindesaminase (E.C. 3.5.4.4). Aus der prinzipiellen Ähnlichkeit der Desaminierungsreaktion von Adenosin und AMP wird ein vergleichbarer Mechanismus abgeleitet [84]. Das vorgeschlagene tetraedrische Purinylzwischenprodukt aus AMP und Enzym könnte Ammoniak abspalten und ein weiteres Zwischenprodukt liefern, das von Wasser rasch an der 6-Position angegriffen würde. Dieser labile tetraedrische Komplex zerfiele in IMP und freies Enzym [103-105].

Solche Analogiebetrachtungen stoßen allerdings sehr schnell auf eine Grenze; während Adenosindesaminase nur aus einer Polypeptidkette besteht, keine prostetische Gruppe enthält und keine weiteren Cofaktoren benötigt [106], ist die aus vier Untereinheiten aufgebaute K^+-abhängige AMP-Desaminase ein Zn-Metalloenzym. Da das Apoenzym inaktiv ist, muß Zn^{++} an dem Mechanismus der Katalyse beteiligt sein, sei es, daß es Substratladungen ausgleicht oder einen nucleophilen Angriff auf das Reaktionszentrum erleichtert; für beide Funktionen gibt es Beispiele anderer Zn-haltiger Enzyme [107]. Um die räumliche Beschaffenheit des aktiven Zentrums in AMP-Desaminase (Kaninchenmuskel) abzutasten,

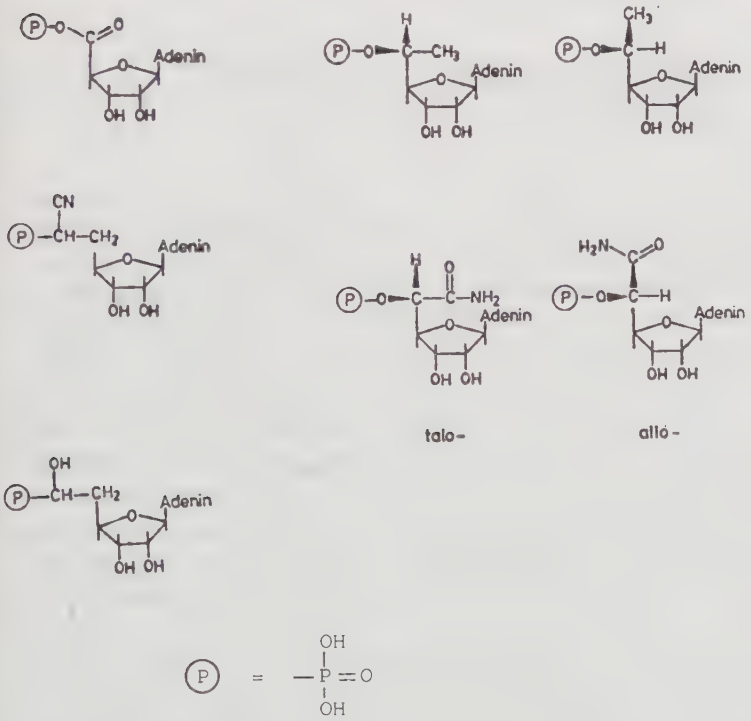


Abb. 28 : AMP-analoge Phosphor- und Phosphonsäuren

sind verschiedene 5'- und 6'-Adenosinphosphor- und -Phosphonsäuren [108,109] (P-C-Bindung) sowie gemischte Phosphorsäure-5'-Adenosincarbonsäureanhydride [110] synthetisiert und auf Substrat- bzw. Effektoreigenschaft getestet worden (Abb. 28). Die aus diesen Experimenten gewonnenen Aussagen über das 'Platzangebot' im aktiven Zentrum sind jedoch nur grob qualitativ und untereinander kaum vergleichbar, weil die synthetischen potentiellen Substrate sich in mehreren Strukturparametern gleichzeitig unterscheiden. Über den Mechanismus der Desaminierungsreaktion ermöglichen sie keine neuen Aufschlüsse. Weitergehende Informationen lassen sich aus Experimenten mit den homologen Adenosincarbonsäuren ableiten.

2.2.1.2. Adenosincarbonsäuren als Substrate der AMP-Desaminase

AMP-Desaminase ist spezifisch für Adeninnucleotide mit einem Phosphatmonoanion am C-5'-Terminus [17]. Wie wir finden, setzt sie aber auch die analogen Carbonsäuren um. Alle homologen 5'-Adenosincarbonsäuren, einschließlich der 7'-(5',6'-Didehydro)-adenosincarbonsäure und des natürlichen Substrats 5'-AMP werden AMP-Desaminase aus Kaninchenmuskel als Substrate angeboten. Man verwendet als Puffersysteme MES-TRIS (pH 6,0 und 6,5) und HEPES-TRIS (pH 7,0 und 7,5), die sich bei anderen Experimenten mit AMP-Desaminase bewährt haben [111] und die mit TRIS neutralisierten freien Säuren der Substrate. Dies hat den Vorteil, daß man die Aktivatorkonzentration K^+ frei wählen und unabhängig von der Substratkonzentration konstant halten kann. In Tabelle 2 sind die K_M- und relativen V_{max}-Werte zusammengestellt, soweit sie aus doppeltreziproken Auftragungen zu erhalten sind (Abb. 29 ff). Für pH 6,5 sind die Daten vollständig. 7'-Adenosincarbonsäure wird mit der höchsten Maximalgeschwindigkeit (V_{rel} = 21 %, AMP: V = 100 %) umgesetzt und weist inner-

Substrat	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5
5'-Säure		i n a k t i v		
6'-Säure	1,2 (0,2)	4,5 (0,6)	5,5 (2,5)	10
7'-Dehydrosäure	1,3 (1,2)	1,9 (3,5)		
7'-Säure		0,8 (21)		
5'-AMP	3,0 (450)	0,45 (100)$^{+}$		

$^{+}$ entspricht 0,2 nkat

Tabelle 2 : Kinetische Parameter der Desaminierung von Adenosincarbonsäuren und AMP durch AMP-Desaminase; K_M-Werte (mM) und relative V_{max}-Werte (in Klammern)

halb der Adenosincarbonsäuren auch den niedrigsten K_M auf, der nur etwa doppelt so groß ist wie der von AMP. Gleichfalls Substrate sind 7'-Didehydroadenosincarbonsäure (V_{rel} = 3,5 %; K_M = 1,9 mM) und 6'-Adenosincarbonsäure, die als schlechtestes Substrat (K_M = 4,5 mM) auch mit der geringsten Maximalgeschwindigkeit umgesetzt wird. 5'-Adenosincarbonsäure besitzt jedoch keinerlei Substrataktivität. 6'- und 7'-Dehydroadenosincarbonsäure werden bei pH 6,0 mit drei- bis viermal geringerer Maximalgeschwindigkeit umgesetzt als bei pH 6,5; die pH-Erniedrigung hat auch, besonders im Fall der 6'-Adenosincarbonsäure, deutlich erniedrigte K_M-Werte zur Folge, die sich für diese beiden Substrate nur unwesentlich unterscheiden und bereits in der Größenordnung des K_M von 7'-Adenosincarbonsäure (bei pH 6,5) liegen. Die stark erhöhte maximale Reaktionsgeschwindigkeit der AMP-Umsetzung bei pH 6,0 bei gleichzeitig erheblich verschlechterter Substratbindung (K_M steigt von 0,45 auf 3 mM) ist in der Tendenz zweifelsfrei.

Die Absolutgröße der kinetischen Parameter kann jedoch mit einem Fehler behaftet sein, der keine meßtechnischen Ursachen hat, sondern auf Eigenschaften der AMP-Desaminase wie irreversible Dissoziation des tetrameren Enzyms bei Verdünnung [111,112] und zusätzliche Aktivierung durch H^+ [113] beruht. Dieselben

Gründe sind für die Lücken in Tabelle 2 verantwortlich. Die spezifische Aktivität der verwendeten Enzympräparation läßt im photometrischen Test für das gute Substrat 7'-Adenosincarbonsäure nur Enzymkonzentrationen von maximal 0,1 µg Protein pro ml zu, die für AMP als Substrat noch unterschritten werden müssen. Damit liegt man aber in einem Konzentrationsbereich, der zur Dissoziation des tetrameren Enzyms und damit zu einer Inaktivierung führt; dieses Verhalten wird durch niedrige Substratkonzentrationen, wie sie bei AMP und 7'-Adenosincarbonsäure als Substrate angewandt werden müssen (Variation der Substratkonzentration zwischen 0,3 und 3 K_M), noch begünstigt und kann nicht durch Anpassung der Aktivatorkonzentration ausgeglichen werden. Sigmoidale Kinetiken mit gekrümmten Lineweaver-Burk-Plots sind die Folge, die Kooperativität (Hillkoeffizient n_H>1) vortäuschen und deren Tangenten z.T. die positive 1/S-Achse schneiden. Diese Effekte treten verstärkt bei pH 7,0 und 7,5 auf, wo außer der Enzymdissoziation noch die pH-Abhängigkeit zum Tragen kommt: Die Dissoziationskonstante für die K^+-Aktivierung steigt ab pH 6,5 steil an [113], sodaß 0,2 M KCl, wie in allen Tests verwendet, nicht über die pH-Skala von 6,0 bis 7,5 das gleiche Ausmaß an Aktivierung bewirkt. Je nachdem, um welches Substrat es sich handelt, machen sich in Kinetikserien, wo die oben erwähnten Artefakte auftreten, Enzymdissoziation und pH-abhängige K^+-Aktivierung verschieden stark bemerkbar. Besonders Meßreihen mit AMP und 7'-Adenosincarbonsäure sind wegen der erforderlichen niedrigen Enzymkonzentrationen erschwert; die in Abb. 29 und 30 dargstellten normalen Lineweaver-Burk-Plots ergeben sich, wenn man Enzymlösungen mit 10 % der Ausgangsaktivität verwendet. Der Aktivitätsabfall bleibt dann über die gesamte Reaktionszeit vernachlässigbar klein. Um all diese Komplikationen zu vermeiden, müssen Enzymkonzentrationen über 5 µg pro ml angewandt werden; die resultierenden hohen Reaktionsgeschwindigkeiten wären dann jedoch - auch im Falle der 7'-Adenosincarbonsäure mit seinen dem AMP vergleichbaren Substrateigenschaften - nur durch Stopped-Flow-Technik zu verfolgen [112]. Dagegen sind 7'-Dehydroadenosincarbonsäure und vor allem 6'-Adenosincarbonsäure als ideale Substrate anzusehen, weil die Enzymkonzentrationen groß

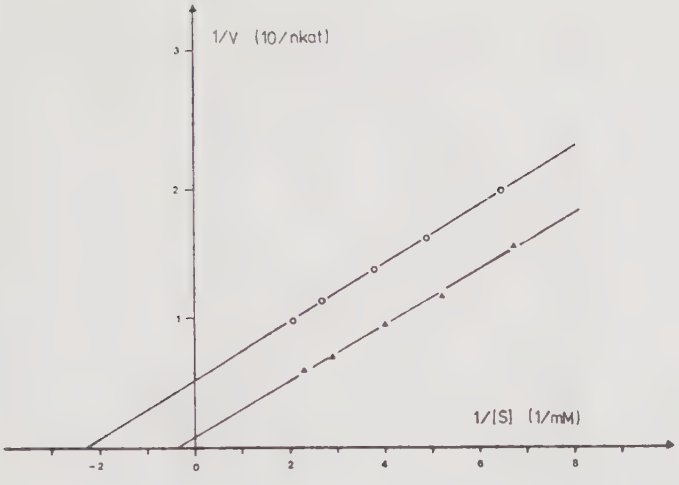


Abb. 29 : Lineweaver-Burk-Diagramm der Desaminierung von 5'-AMP durch AMP-Desaminase bei pH 6,0 (▲) und pH 6,5 (O).

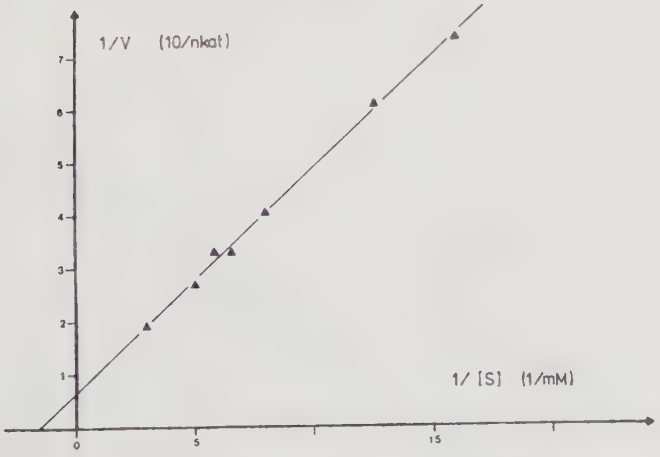


Abb. 30 : Lineweaver-Burk-Diagramm der Desaminierung von 7'-Adenosincarbonsäure durch AMP-Desaminase bei pH 6,5.

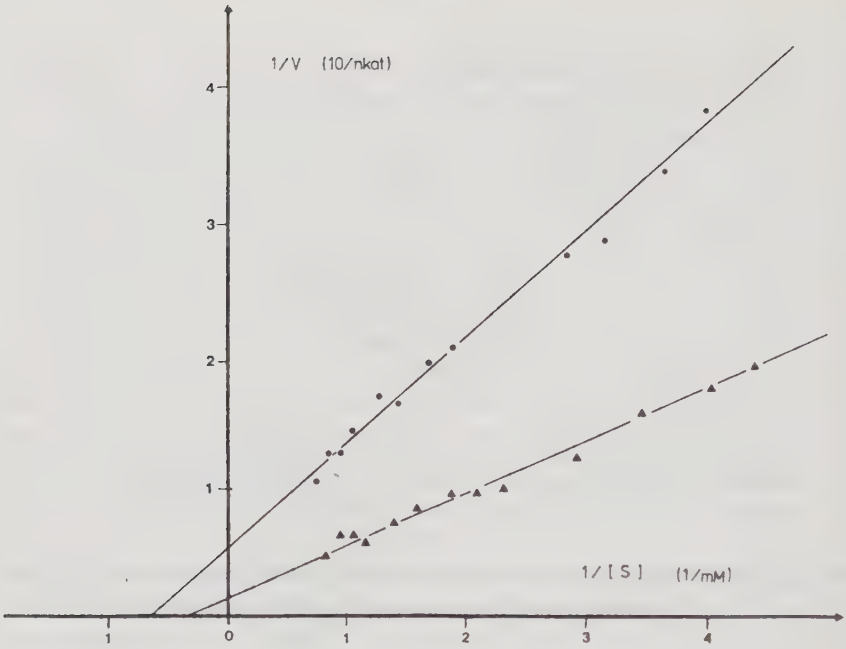


Abb. 31 : Lineweaver-Burk-Diagramme der Desaminierung von 7'-Dehydroadenosincarbonsäure durch AMP-Desaminase bei pH 6,0 (●) und pH 6,5 (▲).

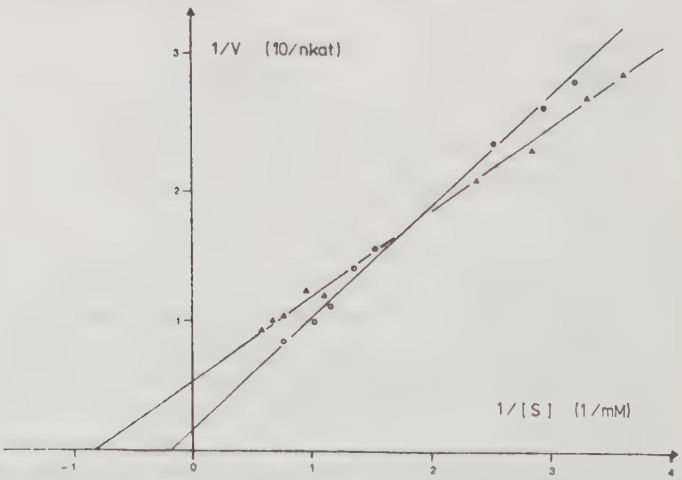


Abb. 32 : Lineweaver-Burk-Diagramme der Desaminierung von 6'-Adenosincarbonsäure bei pH 6,0 (▲) und pH 6,5 (o).

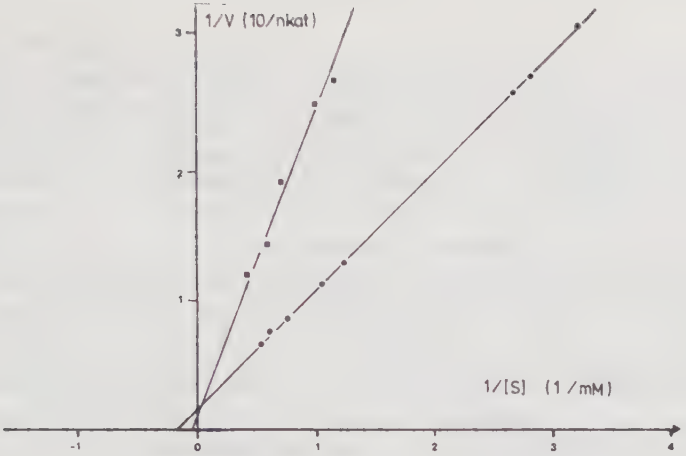
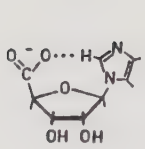
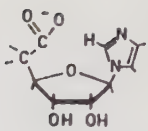
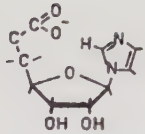
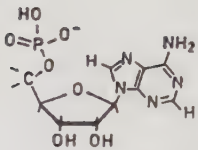


Abb. 33 : Lineweaver-Burk-Diagramm der Desaminierung von 6'-Adenosincarbonsäure durch AMP-Desaminase bei pH 7,0 (●) und pH 7,5 (■).

genug gewählt und dennoch die Kinetik mit normaler zeitlicher Auflösung untersucht werden kann.

Die Abstufung der relativen Maximalgeschwindigkeiten und der K_M-Werte innerhalb der 5'-homologen Adenosincarbonsäuren, soweit sie Substrate sind, verläuft bei pH 6,5 parallel zum Abstand der Carboxylatgruppe von Base und Zucker. Bei der 7'-Adenosincarbonsäure ist die anionische Funktion nach der Anzahl der Bindungen vom Riboserest gleichweit entfernt wie in AMP. Die gesättigte 5'-C-Kette bedingt innerhalb der Carbonsäuren die meisten Rotationsfreiheitsgrade und damit die größte Zahl Einstellungsmöglichkeiten der Carboxylatgruppe relativ zu den übrigen Gruppen des Moleküls, sodaß eine bessere Anpassung an die Gegebenheiten des aktiven Zentrums erfolgen kann. Wie die PMR-Daten in Abb. 34 zeigen (geringes $\Delta\delta$ der Purinprotonen) und der fehlende Deuteriumaustausch gegen H-8 bei Raumtemperatur bestätigt, liegt auch keine konformative Beschränkung wie bei 5'-Adenosincarbonsäure aufgrund einer starken Wechselwirkung zwischen Purin und Carboxylat vor. Die dem AMP vergleichbare Substrateigenschaft von 7'-Adenosincarbonsäure

5' 6' 7' 5'-AMP

Adenosincarbonsäuren

$\Delta\delta$ (ppm) :	0,43	0,12	0,16	0,27

Abb. 34 : Differenz der chemischen Verschiebungen von H-8 und H-2 ($\Delta\delta = \delta$H-8 - δH-2) als Maß für die Wechselwirkung zwischen 5'-Substituent und Adeninbase in AMP und Adenosincarbonsäuren [70].

läßt sich also nicht nur mit Strukturmerkmalen, sondern auch mit seiner flexiblen anti-Konformation in Lösung begründen. In der 7'-Dehydrosäure ist zwar noch der mit AMP vergleichbare Abstand des Monoanions zu Base und Zucker gegeben, aber die transkonfigurierte 5',6'-Doppelbindung bringt eine fixierte Geometrie am 5'-Ende mit sich. Das findet seinen Ausdruck in einer verringerten Maximalgeschwindigkeit und verschlechterten Substratbindung (Abb. 31). Nach dem relativen V_{max}-Wert und dem hohen K_M-Wert bei pH 6,5 (K_M (6'-Säure) = 10 K_M (AMP) zu urteilen, ist 6'-Adenosincarbonsäure das schlechteste Substrat der AMP-Desaminase (Abb. 32 und 33). Betrachtet man aber die nahezu identischen K_M-Werte von 6'- und 7'-Dehydroadenosincarbonsäure bei pH 6,0 (Tabelle 2), so fällt auf, daß für die Bindung des Substrats an das aktive Zentrum - zumindest beim durch Protonenaufnahme aktivierten Enzym - nicht allein der Abstand des Monoanions relativ zu den übrigen Gruppen im Modellnucleotid entscheidend sein kann. Obwohl die Länge der exocyclischen C-Kette bei der 6'-Säure gegenüber der 7'-Dehydrosäure um eine C-C-Bindung kürzer ist als optimal, wird sie sogar noch besser im aktiven Zentrum gebunden. Man muß daher eine ausschlaggebende Rolle der Konformation für die Substratbindung annehmen. 6'-Adenosincarbonsäure weist innerhalb der Adenosincarbonsäuren den geringsten $\Delta\delta$-Wert auf (Abb. 34) und es können

daher alle Einstellungsmöglichkeiten des 5'-Substituenten, weitgehend unabhängig von einer Carboxylat-Purin-Wechselwirkung verwirklicht sein, bei gleichzeitig unveränderter anti-Konformation (angezeigt durch den negativen Cottoneffekt im langwelligen Teil des CD-Spektrums; vgl. 2.1.5.2.).

Die kurzkettige 5'-Adenosincarbonsäure ist als Substrat inaktiv. Obwohl die anionische Funktion direkt am C-4' des Furanoserings sitzt, würde man dennoch erwarten, daß die 5'-Säure vom Enzym gebunden werden kann, denn elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Carboxylation und einer positiv geladenen Gruppe im aktiven Zentrum des Enzymproteins erfordern weniger strenge räumliche Ausrichtung als z.B. eine Wasserstoffbrücke. Wir machen deshalb für die fehlende Substrateigenschaft von Adenosinuronsäure ihre vollkommen starre Molekülkonformation verantwortlich [114], die durch eine H-Brücke zwischen Carboxylat und H-8 hervorgerufen wird (Abb. 34). Die Bindung von 5'-Säure in der katalytischen Bindungsstelle kann auch deshalb ausgeschlossen werden, weil die AMP-Desaminierung in Gegenwart der Uronsäure rascher abläuft [18]. Für die Existenz einer weiteren, aktivierenden Bindungsstelle anderer Spezifität gibt es seit kurzem weitere Hinweise [112].

Die hier vorgestellten Ergebnisse legen allgemein den Schluß nahe, daß für die Bindung eines potentiellen Substrats im katalytischen Zentrum von AMP-Desaminase weniger der Abstand eines Monoanions am 5'-Ende zum 6-Aminopurin und zur Ribose wichtig ist, als vielmehr die konformative Flexibilität des exocyclischen 5'-Substituenten. Parallel mit dem Abstand der anionischen Gruppe verändert sich vielmehr die Größe der Maximalgeschwindigkeiten , die sich bei pH 6,0 und pH 6,5, also unabhängig vom Ausmaß der H^+-Aktivierung, im selben Verhältnis abstufen (AMP $\gg$ 7'-Dehydrosäure $>$ 6'-Säure). Eine Abstandsvariation am 5'-Ende hat damit größeren Einfluß auf die Enzym-Substrat-Wechselwirkung am eigentlichen Reaktionsort als auf die Spezifität seiner Bindung (Größe des K_M) an die katalytische Bindungsstelle insgesamt. Da Adenin und Ribose-5-phosphat allein nicht gebunden werden, ist eine Adenosinstruktur mit

anionischem 5'-Substituenten zwingende Voraussetzung für eine Enzym-Substratbindung. Vergleichbare K_M-Werte für Substrate unterschiedlicher 5'-C-Kettenlänge besagen aber offenbar noch nichts über die Ausrichtung des Purins im katalytischen Zentrum, die mittelbar durch die Länge des anionischen 5'-Substituenten bestimmt wird und die zu den unterschiedlichen Maximalgeschwindigkeiten führen sollte. Die hier diskutierten Ergebnisse sind außerdem ein unabhängiger Beweis dafür, daß die aktivierende Wirkung von K^+ nicht von einer Wechselwirkung mit dem Substrat herrühren kann, weil die kinetischen Parameter für AMP und 7'-Adenosincarbonsäure in der gleichen Größenordnung liegen und die Wechselwirkung von K^+ mit Phosphat bzw. Carboxylatgruppe sicher zu unterschiedlichen Effekten führen sollte. Die verbesserte Enzym-Substratbindung, die wir bei pH 6,0 finden, stehen in Einklang mit dem kürzlich vorgeschlagenen Zusammenhang zwischen pH und K^+-Aktivierung von AMP-Desaminase aus Kaninchenmuskel [113]. Der K_M-Wert für die Desaminierung von AMP bei pH 6,0 mag aufgrund der oben dargelegten Komplikationen mit verdünnten Enzymlösungen zu hoch sein; da die Tendenz aber zweifelsfrei ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei pH 6,0 bereits die Protonierung des Substrats eine Rolle spielt, das so nicht mehr gebunden wird. Auch in diesem Fall empfiehlt sich 6'-Adenosincarbonsäure als ideales AMP-analoges Modellnucleotid, da die Desaminierungsreaktion bei hoher Enzymkonzentration und mit normaler Registriergeschwindigkeit verfolgt werden kann und keine Artefakte zu befürchten sind. Für Enzymstudien in einem weiter ausgedehnten pH-Bereich kommen schließlich nur noch Adenosincarbonsäuren in Betracht, an deren monoanionischer Struktur (pK_s-Werte um 4) sich nichts ändert.

2.2.1.3. Vergleich mit Adenosindesaminase

Adenosindesaminase (Adenosinaminohydrolase, E.C. 3.5.4.4) unterscheidet sich von AMP-Desaminase in der Substratspezifität streng durch das Erfordernis eines neutralen CH_2OH-Substituenten am 5'-Terminus von Adeninnucleosiden. Dementsprechend setzt sie auch die homologen Adenosincarbonsäuren nicht um. Eine experimentelle Prüfung dieses (erwarteten) Verhaltens war Voraussetzung für den Gebrauch der Desaminase als Hilfsenzym im Test auf 5'-Nucleotidase und deren Hemmung durch die Adenosincarbonsäuren (s. 2.2.3.). Immerhin lag Substrataktivität von Adenosincarbonsäurenitril, -Amid und -Esterderivat gegenüber Adenosindesaminase im Bereich des Möglichen, da diese Substituenten ähnlich dem CH_2OH-Rest polar, aber ungeladen sind. Dennoch akzeptiert Adenosindesaminase aus Kälberdarm auch diese Verbindungen nicht als Adenosinanaloge, ihre Substratbindungsstelle muß eine absolut spezifische Wechselwirkung mit der OH-Gruppe beinhalten.

2.2.2. Adenosincarbonsäuren als Inhibitoren der Myokinase

Myokinase (ATP:AMP-Phosphotransferase, E.C. 2.7.4.3) katalysiert die reversible Reaktion

$$ATP + AMP \rightleftharpoons 2\ ADP$$

und findet sich in hohen Aktivitäten überall dort, wo der Turnover von Adeninnucleotiden besonders hoch ist, wie in Muskel oder Mitochondrien. Die physiologische Rolle der Myokinase ist nicht wie bei AMP-Desaminase in einer Stabilisierung der energy charge zu sehen, denn an der Gesamtzahl der Phosphorsäureanhydridbindungen ändert die Myokinasereaktion nichts, sie stellt vielmehr ein Gleichgewicht zwischen AMP, ADP und ATP her. Während sich die Hinweise auf eine enge Beteiligung der AMP-Desaminase am kontraktilen System mehren, kann für Myokinase eine essentielle Funktion im kontraktilen System ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund und wegen der weiten, keineswegs auf

Muskelgewebe beschränkten Verbreitung ist dem Trivialnamen Adenylatkinase für alle Enzyme, die die gleiche Reaktion katalysieren, eigentlich der Vorzug zu geben. Durch die Reversibilität der Reaktion wird der Energieinhalt der β-Phosphatanhydridbindungen des ADP verfügbar gemacht und so für die energetische Ökonomie lebender Systeme gesorgt.

Die unten verwendeten Myokinasen aus Kaninchen- und Schweinemuskel unterscheiden sich im Molekulargewicht (21 000)[115] und in der Aminosäurezusammensetzung nur unwesentlich voneinander und von anderen Myokinasen aus Muskel; in jedem Fall wird zur Aktivität ein zweiwertiges Kation benötigt. Mg^{++} ist am effektivsten [116]; nur die 1:1-Komplexe von ATP bzw. ADP (über die α- und β-Phosphatgruppen) werden gebunden. Sowohl basensubstituierte als auch zuckersubstituierte Nucleosidtriphosphate werden toleriert, jedoch mit reduzierter Aktivität umgesetzt. Generell weist die AMP-Bindungsstelle die strengere Spezifität auf als die ATP-Bindungsstelle : Basensubstituenten bei AMP führen meist zu völligem Aktivitätsverlust, während basensubstituierte ATP-Derivate noch merklich umgesetzt werden. Beispielsweise ist ITP in Gegenwart von AMP Substrat, ATP wird mit IMP jedoch nicht umgesetzt [117]. Diese Befunde werden durch PMR-Studien [118] und Untersuchungen mit fluoreszenzmarkiertem AMP [119] bekräftigt. Der Mechanismus der Phosphoryltransferreaktion folgt, wie bei Adenylatkinase aus Kaninchenmuskel gefunden, einem Random-Bi-Bi-Mechanismus: Bindung von AMP und MgATP und Abdissoziation der beiden ADP Moleküle in jeweils beliebiger, nicht unterscheidbarer Reihenfolge[120].

Den nachfolgend beschriebenen Experimenten mit Myokinase aus Kaninchenmuskel und Schweinemuskel liegen konstante Konzentrationen von ATP und Mg^{++} bei unverändertem pH-Wert zugrunde. Bei jeweils fester AMP-Konzentration werden gleichzeitig variierte Konzentrationen von 5'-, 6'-, 7'-Dehydro- und 7'-Adenosincarbonsäure als AMP-analoge Modellverbindungen angeboten. Eine Substrateigenschaft der Nucleosidcarbonsäuren muß zwar ausgeschlossen werden, da die Bildung eines gemischten Anhydrids aus Phosphorsäure und Nucleosidcarbonsäure nicht möglich ist.

Jedoch hemmen die 7'-Adenosincarbonsäuren deutlich, wie die Abbildung 35 ff. und die Tabelle 3 zeigen. Die K_i-Werte liegen für beide Enzyme in der gleichen Größenordnung. Effektivster Inhibitor ist 7'-Adenosincarbonsäure (K_i(Säure) $\approx$ 7 K_M(AMP)), gefolgt von 7'-Dehydroadenosincaronsäure (K_i(Säure) $\approx$ 15 K_M (AMP)); inaktiv sind 5'- und 6'-Säure bei Kaninchen- und Schweinemuskelenzym. Die Dixonplots lassen auf eine kompetitive Hemmung durch 7'-Säuren schließen (Abb. 35 - 37). Da diese Auftragungen aber bisweilen keine eindeutigen Aussagen über den Hemmungstyp zulassen [121], wird in jedem Fall der eindeutige direkt-lineare Plot nach Eisenthal / Cornish-Bowden [122-124] zur Kontrolle verwendet, wie in Abbildung 38 an einem Beispiel dargestellt. Alle scheinbaren K_M-Werte streuen um eine Gerade (gestrichelt), die parallel zur S-Achse verläuft und rein kompetitive Hemmung beweist. Substrat und Inhibitor werden also ausschließlich und wechselseitig von ein und derselben Enzymbindungsstelle angelagert; dieser Aspekt ist wichtig für die weitere Diskussion.

Inhibitor	Myokinase aus Kaninchenmuskel K_i (mM)	Schweinemuskel K_i (mM)
5'-Adenosincarbonsäure	-	-
6'-Adenosincarbonsäure	-	-
7'-Dehydroadenosincarbonsäure	4,6	5,8
7'-Adenosincarbonsäure	1,7	2,1
5'-AMP	K_M (mM): 0,3	K_M (mM): 0,3

Tabelle 3 : Kompetitive Hemmung der Myokinase durch 7'-Adenosincarbonsäuren in TRIS-Cl pH 7,6; 0,1 M KCl, 1 mM $MgSO_4$ bei 25°C.

Die Übereinstimmung der Inhibitoren und deren Wirksamkeit und Hemmungscharakteristik (jeweils rein kompetitiv) für beide Enzyme muß in einer vergleichbaren Aminosäurezusammensetzung begründet sein (je 191 Aminosäurereste, als größte Abweichung

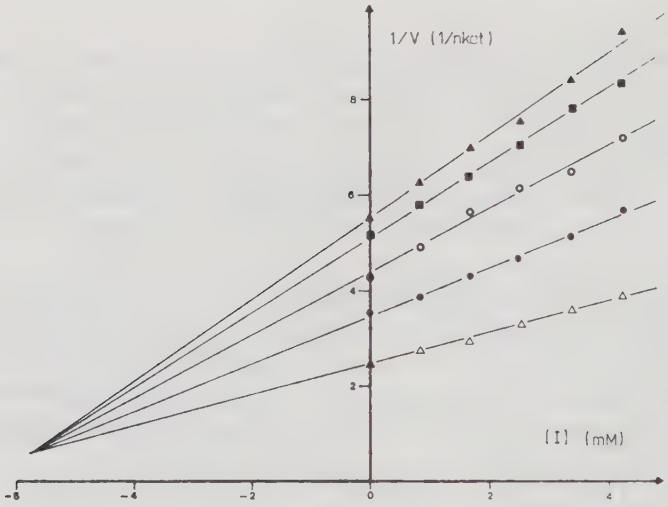


Abb. 35 : Dixon-Plot der Inhibierung von Myokinase (Schwein) durch 7'-Dehydroadenosincarbonsäure in Gegenwart von 133 µM (△), 84 µM (●), 64 µM (○), 56 µM (■) und 50 µM (▲) AMP.

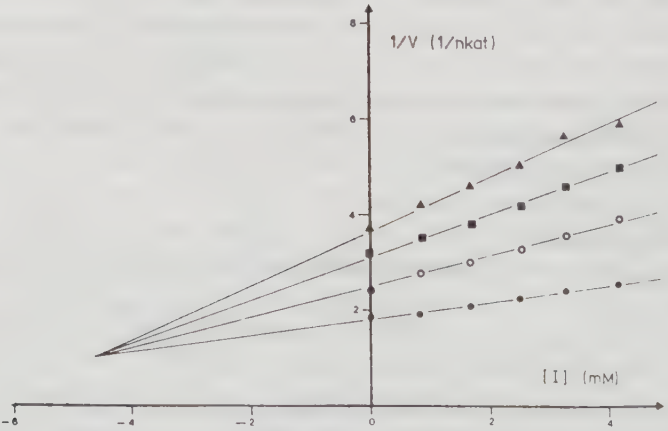


Abb. 36 : Dixon-Plot der Inhibierung von Myokinase (Kaninchen) durch 7'-Dehydroadenosincarbonsäure in Gegenwart von 116 µM (●), 74 µM (○), 56 µM (■) und 44 µM (▲) AMP.

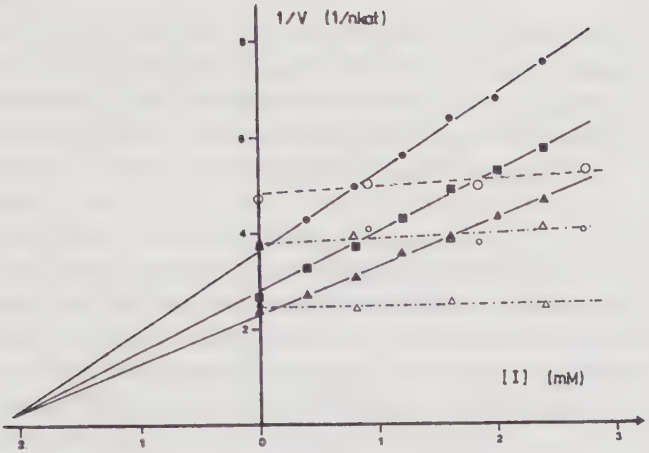


Abb. 37 : Dixon-Plot der Inhibierung von Myokinase (Schwein) durch 7'-Adenosincarbonsäure (——) in Gegenwart von 45 µM (●), 58 µM (■) und 76 µM (▲) AMP; keine Inhibierung durch 5'-Adenosincarbonsäure (-·-) und 6'-Adenosincarbonsäure (- -).

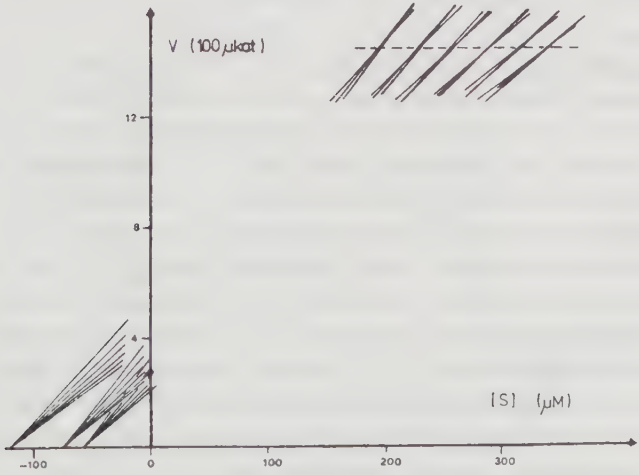


Abb. 38 : Inhibierung von Myokinase (Kaninchen) durch 7'-Adenosincarbonsäure (0,6; 1,1; 1,7; 2,2 und 2,8 mM); Darstellung nach Eisenthal / Cornish-Bowden [122].

enthält Schweinemyokinase 4 Alaninreste mehr [115]), die übereinstimmende, wenn nicht identische AMP-Bindungsstellen wahrscheinlich macht. Wie bei AMP-Desaminase ist auch hier 5'-Adenosincarbonsäure gänzlich inaktiv. Dafür ist in diesem Fall wohl nicht nur seine weitgehend fixierte Konformation, sondern der geringe Abstand des Monoanions von Base und Zucker verantwortlich; da auch die verlängerte 6'-Säure innerhalb physiologischer Konzentrationsbereiche inaktiv ist und erst die 7'-Adenosincarbonsäuren deutlich hemmen, spielt bei der Adenylatkinase offenbar der Abstand des Monoanions zu den übrigen Gruppen des Moleküls für die Bindung die wichtigste Rolle. Die Bedeutung der konformativen Flexibilität kommt aber noch in den deutlich verschiedenen K_i-Werten für 7'- und 7'-Dehydrosäure zum Ausdruck; die transkonfigurierte 5',6'-Doppelbindung reduziert die Einstellungsmöglichkeiten des Carboxylatanions und verschlechtert die Anpassung an die Substratbindungsstelle. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei AMP-Desaminase, wo innerhalb der Adenosincarbonsäuren im Wesentlichen konformative Aspekte für die Substratbindung wichtig sind, macht sich hier konformative Beweglichkeit erst bemerkbar, wenn das Substratanaloge die 'richtige' C-Kettenlänge besitzt. Da Adenylatkinase basensubstituierte Purinnucleosid-5'-phosphate kaum toleriert und Nucleosidcarbonsäuren mit unveränderter Adeninbase nur bindet, wenn der anionische 5'-Substituent die richtige Länge aufweist, ist ein enges Zusammenwirken von Adeninbase, Riboserest (eine 2'-Desoxystruktur führt zu stark verringerter Aktivität [9]) und anionischem 5'-Substituenten beim Mechanismus der Bindung von Substrat bzw. Inhibitor wichtig. In den homologen Adenosincarbonsäuren wird ein Strukturelement variiert, das bei der Adenylatkinasereaktion genau am Reaktionsort liegt; insofern überrascht nicht, daß es primär von der Kettenlänge des anionischen Rests abhängt, ob es überhaupt zur Bindung an das aktive Zentrum kommt oder nicht. Umgekehrtes gilt für das AMP-Desaminase-System: Die Länge des 5'-Substituenten spielt für die Substratbindung nicht die primäre Rolle und der Abstand zwischen dem Ort der Reaktion und dem Ort der strukturellen Modifikation ist groß. Auch bei Adenylatkinase wird

die in Lösung vorherrschende anti-Konformation im aktiven Zentrum beibehalten; diesen Schluß legt die Substrateigenschaft von 8,5'-Cycloadenosin-5'-phosphat, einem konformationsfixierten AMP-Analogen [125] nahe. Die anti-Konformation der Nucleosidcarbonsäuren in Lösung und deren inhibierende Wirkung steht damit in Einklang.

Wie schon bei AMP-Desaminase beobachtet, wird durch die Untersuchung der Adenylatkinasen mit den homologen Adenosincarbonsäuren eine sehr enge Toleranz des aktiven Zentrums für Strukturabweichungen des Substrates sichtbar. Wegen der zentralen physiologischen Bedeutung beider Enzyme ist diese strenge Substratspezifität als Notwendigkeit zu verstehen.

2.2.3. Adenosincarbonsäuren als Inhibitoren der 5'-Nucleotidase

5'-Nucleotidasen (E.C. 3.1.3.5) katalysieren die Hydrolyse von Nucleosid-5'-monophosphaten zu Nucleosiden und anorganischem Phosphat; sie sind weit verbreitet und stellen nach ihren Eigenschaften eine heterogene Gruppe von Enzymen dar [9]. 5'-Nucleotidasen widersetzen sich vielfach der Reinigung; so ist die handelsübliche Nucleotidasepräparation aus Schlangengift, die wir bei unseren Experimenten mit Adenosincarbonsäuren verwenden, mit Nucleotidasen anderer Spezifität verunreinigt, deren geringer Anteil (< 1 %) aber hier vernachlässigt werden kann. Das Enzym aus Schlangengift hydrolysiert alle Ribo- und Desoxyribo-5'-monophosphate mit starker Präferenz für 5'-AMP. 3'-Nucleotide, ATP, Ribose-5-phosphat und p-Nitrophenylphosphat werden ebensowenig umgesetzt wie Dinucleotide [127]. Strukturvoraussetzung für eine Substrateigenschaft ist neben einer Phosphatgruppe am 5'-Ende eines Ribosids oder Desoxyribosids eine freie 3'-Hydroxylgruppe. Homologe Adenosincarbonsäuren scheiden als Substrate aus, weil statt einer Phosphatesterbindung eine C-C-Bindung getrennt werden müßte. Setzt man aber 5'-AMP in Gegenwart variierter Konzentrationen von 5'-, 6'-, oder 7'-Adenosincarbonsäure um, so beobachtet man in allen Fällen kompetitive

Hemmung (Abbildungen 40 - 43; weitere Diagramme in 3.2.2.). 6'-Adenosincarbonsäure hemmt bei beiden untersuchten pH-Werten am stärksten ($K_i \approx 2{,}5\ K_M$);die von 5'- und 7'-Adenosincarbonsäure bewirkte Inhibierung ist schwächer, aber für beide Verbindungen in der gleichen Größenordnung (Tabelle 4). Der Hemmungstyp ist, wie Lineweaver-Burk (Abb. 40) und Dixonauftragungen vermuten lassen (Abb. 41), kompetitiv. Wie bei den Kinetiken der Myokinase bringen Diagramme nach Eisenthal / Cornish-Bowden letztlich Klarheit, daß es sich in allen Fällen um rein kompetitive Hemmung handelt. (Scheinbare K_M-Werte, als Geradenschnittpunkte ermittelt, liegen auf einer Geraden parallel zur S-Achse; Abb. 42 und 43). Diese Tatsache ist um so bemerkenswerter, als bei modifizierten AMP-Derivaten wie D-allo- und L-talo-5'-Methyl-AMP [108](Abb. 39) gemischt kompetitive / nichtkompetitive Hemmung (gleichzeitig allerdings Substrateigenschaft), bei 5'-Desoxy-5'-(dihydoxyphosphinyl)-cyanomethyladenosin (Abb. 39) lediglich nichtkompetitive Hemmung beobachtet wird [126] ($K_i \approx 4\ K_M$ (AMP)). Da rein kompetitive Hemmung eine Inhibitorstruktur voraussetzt, die exakt ins aktive Zentrum paßt (Bindung von I und S muß sich wechselseitig ausschließen), erfüllen die homologen Adenosincarbonsäuren die Gegebenheiten der Substratbindungsstelle weitaus besser, als die oben erwähnten AMP-Derivate, die im Bereich des 5'-Substituenten immerhin die physiologische Phosphatgruppe tragen. Diese Abstufung im Hemmungstyp muß im Zusammenhang mit der Substratspezifität von 5'-Nucleotidase aus Schlangengift gesehen werden.

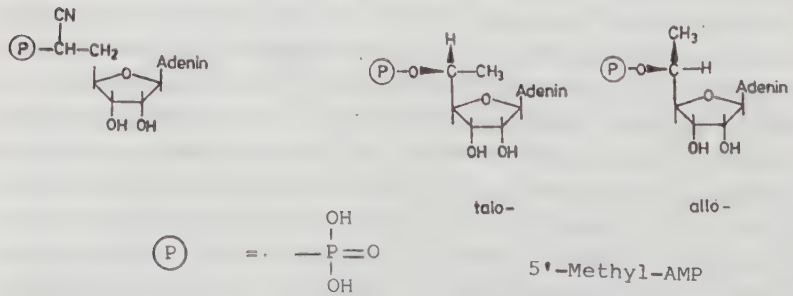


Abb. 39 : 5'-Modifizierte AMP-Derivate

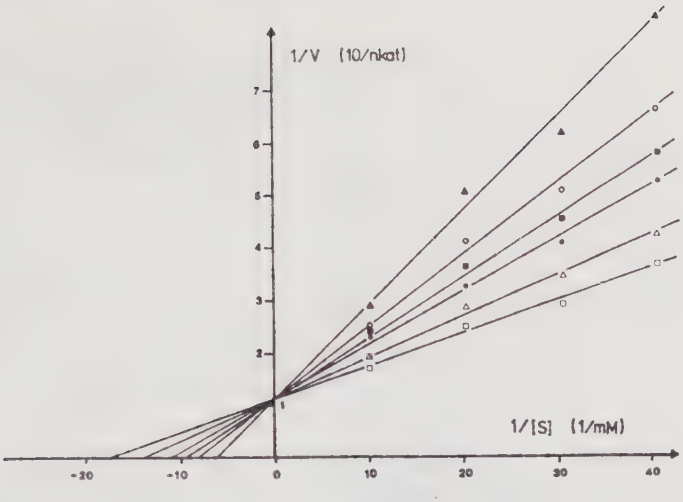


Abb. 40 : Hydrolyse von 5'-AMP durch 5'-Nucleotidase bei pH 6,5 in Gegenwart von 50 µM (□), 100 µM (△), 150 µM (●), 200 µM (■), 250 µM (○) und 350 µM (▲) 6'-Adenosincarbonsäure; Lineweaver-Burk-Diagramme

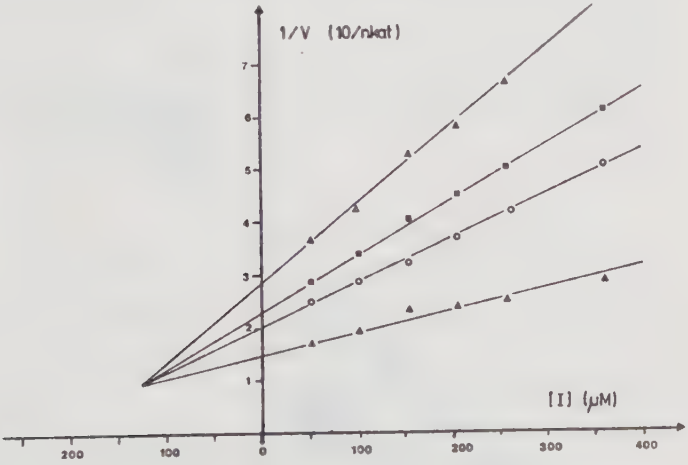


Abb. 41 : Hemmung von 5'-Nucleotidase durch 6'-Adenosincarbonsäure bei pH 8,5; AMP-Konzentrationen : 100 µM (▲), 50 µM (○), 33 µM (■) und 25 µM (△); Auftragung nach Dixon-Webb.

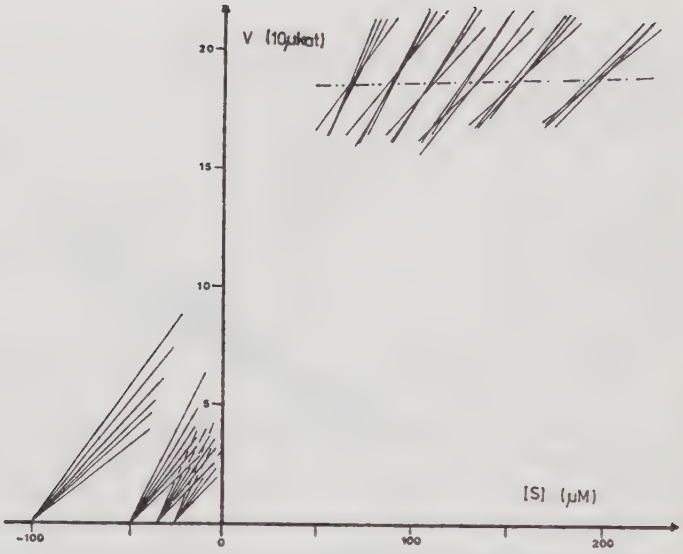


Abb. 42 : Hemmung von 5'-Nucleotidase durch 6'-Adenosincarbonsäure bei pH 8,5; Darstellung nach Eisenthal/Cornish-Bowden [122].

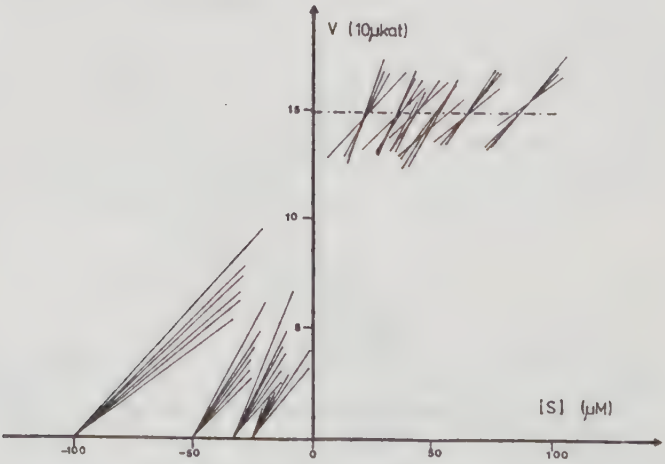


Abb. 43 : Hemmung von 5'-Nucleotidase durch 6'-Adenosincarbonsäure bei pH 6,5; Darstellung nach Eisenthal/Cornish-Bowden [122].

Während der Abschnitt der Substratbindungsstelle, wo die Nucleobase und die 2'-Region des Zuckers angelagert werden, Strukturveränderungen im Substrat zuläßt (NMP und dNMP werden umgesetzt), liegt im Bereich des 5'-Substituenten offenbar eine strenge Spezifität für ein Monoanion mit geringer Toleranz für zusätzliche Substituenten vor. Der Abstand des Anions von Base und Zucker ist aber nicht so kritisch wie bei Adenylatkinase, weil hier die Carbonsäure mit der kürzesten 5'-C-Kette etwa im gleichen Ausmaß hemmt wie die mit der längsten 5'-Kette (7'-Säure); 6'-Adenosincarbonsäure hemmt am stärksten.

AMP wird bei pH 6,5 zwar mit geringerer Maximalgeschwindigkeit hydrolysiert als bei pH 8,5, aber effizienter gebunden (Abb. 44). Der bei pH 8,5 bereits nennenswerte Anteil von doppelt anionisiertem AMP sollte aber nicht für die Erhöhung des K_M verantwortlich sein, weil die Relation - K_M des Substrats AMP / K_i-Werte der in jedem Fall vollständig als Monoanion vorliegenden Adenosincarbonsäuren - pH-unabhängig ist (Vgl. Tabelle 4). Wahrscheinlicher ist, daß der Protonierungsgrad von Gruppen in dem Teil des aktiven Zentrums, wo es zur Fixierung des anionischen 5'-Substituenten kommt, bei pH 6,5 zunimmt und die Bindung von Substrat bzw. Inhibitor gleichermaßen fester wird.

		Adenosincarbonsäuren		
	5'-AMP	5'-	6'-	7'-
	K_M (mM)	K_i (mM)	K_i (mM)	K_i (mM)
pH 6,5	0,014	0,13	0,05	0,11
pH 8,5	0,033	0,40	0,13	0,25

Tabelle 4 : Kinetische Parameter der Hemmung von 5'-Nucleotidase durch Adenosincarbonsäuren bei pH 6,5 (0,1 M MES-TRIS-Puffer) und pH 8,5 (0,1 M TRIS-Cl-Puffer), 25°C.

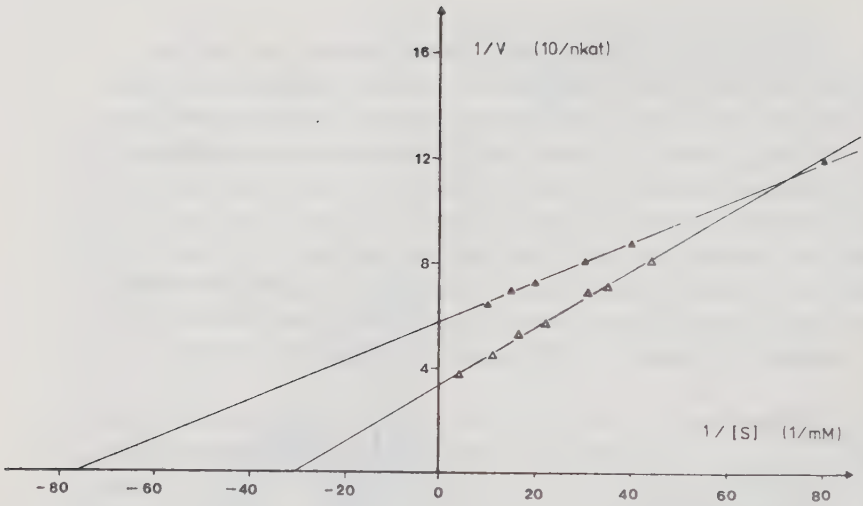


Abb. 44 : Hydrolyse von 5'-AMP durch 5'-Nucleotidase bei pH 6,5 (▲) und pH 8,5 (△); Lineweaver-Burk-Diagramme

Von den bisher mit Adenosincarbonsäuren untersuchten AMP-umsetzenden Enzymen ist die Geometrie der Substratbindungsstelle von 5'-Nucleotidase am wenigsten anspruchsvoll; die optimale 5'-C-Kettenlänge weist 6'-Adenosincarbonsäure auf, aber 5'- und 7'-Säure werden immer noch signifikant gebunden. 5'-Nucleotidase trägt weder zur Stabilisierung der energy charge (Vgl. AMP-Desaminase) noch zum Gleichgewicht der Adeninnucleotide bei (Myokinase). Insofern entsprechen sich einfacherer Aufbau, geringere Substratspezifität und die allgemeine Funktion im Nucleotidstoffwechsel.

In AMP-Desaminase, Myokinase und 5'-Nucleotidase können Nucleoside mit Carboxylatgruppen - passende Moleküldimensionen vorausgesetzt - die Phosphatgruppen der Nucleotide voll simulieren. Dies ist auch auf der Ebene der Anion-Bindung in den Proteinen verständlich: Sowohl Carboxylat- als auch Phosphatgruppen tragende Substrate treten in Enzymen offenbar generell mit kationischen Argininresten in Beziehung [128]. Diese Regel wird durch die synthetischen Modellnucleotide in überzeugender Weise bestätigt.

3. Experimenteller Teil

3.1. Nucleosidsynthesen

3.1.1. Allgemeine Methoden, Geräte und Reagenzien

Chromatografie und Spektroskopie ergänzen sich beim präparativen Arbeiten mit Nucleosiden in idealer Weise. So wurden zur Reaktionsverfolgung, Reinigung und Reinheitskontrolle chromatografische Verfahren angewandt, Identifizierung und Strukturaufklärung gelang durch den Einsatz aller gängigen spektroskopischen Methoden. Auf Schmelzpunktbestimmungen wurde überwiegend verzichtet, weil Nucleoside meist unscharfe, wenig aussagekräftige Schmelzpunkte besitzen; überdies sind gut kristallisierende Nucleoside die Ausnahme, amorphe, oft durch Gefriertrocknung gewonnene Feststoffe die Regel. Durch chromatografisches Verhalten und spektroskopische Eigenschaften ist die Identität aller unten beschriebenen Nucleoside gesichert. Auf Elementaranalysen kann in der Nucleosidchemie verzichtet werden, weil sie keine zusätzlichen Aufschlüsse bringen.

3.1.1.1. Chromatografie

Säulenchromatografie (SC)
mit Kieselgel (Woelm, Aktivitätsstufe I) oder neutralem Aluminiumoxid (Woelm, Aktivitätsstufe I) als Sorbens dient zur groben Produktreinigung und Abtrennung gelöster Salze aus Reaktionsansätzen der Größenordnung 3 mMol und mehr. Zum gleichen Ziel, aber in kürzerer Zeit und mit geringerem Lösungsmitteleinsatz, führt die Trockensäulentechnik mit Kieselgel (Riedel de Haen, mit Fluoreszensindikator) als Sorbens. Als Elutions- bzw. Laufmittel kommt das durch Dünnschichtchromatografie für das jeweilige Trennproblem optimierte Lösungsmittelgemisch zum Einsatz.

Dünnschichtchromatografie (DC)
zur Analyse von Reaktionsgemischen, zu Reinheitstests und zur Kontrolle der Elution bei der SC wird routinemäßig auf Aluminiumfolien (50 x 100 x 0,25 mm und 100 x 200 x 0,25 mm;

Kieselgel, Aluminiumoxid oder Cellulose als Sorbens, jeweils mit Fluoreszenzindikator; Riedel de Haen) und Glasplatten (200 x 200 x 0,2; Cellulose mit Fluoreszenzindikator; Merck) in Tanks mit gesättigter Gasphase ausgeführt. Rein organische Fließmittel mit geringem Anteil einer polaren Komponente und Aluminiumoxid bzw. Kieselgel bringen für geschützte Nucleoside die besten Trennergebnisse; ungeschützte Nucleoside trennen sich besser mit wasserhaltigen Fließmittelsystemen auf Cellulose. Durch Ausnutzung der 20 cm Plattenbreite und Mehrfachentwicklung können bis 10 mg Substanzgemisch pro Platte aufgetrennt werden. Elution ergibt sehr saubere Proben in ausreichender Menge für Kernresonanz-, Infrarotspektroskopie und Massenspektrometrie (s.u.).

Präparative Schichtchromatografie (PSC)
auf 200 x 200 x 2 mm Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator (Merck) eignen sich zur sauberen Auftrennung von 1 mMol-Ansätzen und darunter, wenn Laufmittel und Anzahl der Entwicklungen durch DC-Vorversuche optimiert sind. Lokalisierung der Substanzbänder erfolgt wie bei der DC durch Fluoreszenzlöschung bei 252 nm, die Elution mit destilliertem, getrocknetem Lösungsmittel, um Extraktion von kolloidalem Kieselgel zu vermeiden.

Fließmittelsysteme (V:V) :

A	n-Butanol/Wasser	86:14
B	n-Butanol/Eisessig/Wasser	4:1:5
C	2-Propanol/Ammoniak/Wasser	7:1:2
D	Chloroform/Methanol	6:1
E	Toluol/Methanol	6:1

3.1.1.2. Spektroskopie

Sämtliche untersuchten Substanzen (wie unten beschrieben, käufliche (Boehringer, Serva,Sigma, PWA) oder uns freundlicherweise von anderen überlassene Präparate) sind chromatografisch rein.

Ultraviolettspektroskopie (UV)
Wäßrige Lösungen der Proben werden in 1 cm Quarzküvetten gegen Wasser bei 20°C an einem Cary 15 Spektralphotometer vermessen. Zur Messung zeitabhängiger Veränderungen im Spektrum dient die Repetitive Scan-Einheit mit programmierter Schaltuhr.

Circular-Dichroismus (CD)
Spektren werden an einem Jasco J-20 Einstrahl-Spektropolarimeter bei Raumtemperatur aufgenommen und um Abweichungen der Grundlinie korrigiert. Bei niedrigen Registriergeschwindigkeiten (2,5 - 5 nm/min.) und Anzeigeskalen von 0,001°/cm (Nucleoside) und 0,005°/cm (Cyclo-Nucleoside) wird der Wellenlängenbereich von 320 - 190 nm durchfahren. In 1 cm/3 ml-Quarzküvetten setzen wir wäßrige, ungepufferte Lösungen, pH = 6,5 ± 0,5, mit Extinktionen unter 1,0 (am Extinktionsmaximum) ein. Die CD-Daten sind als molare Elliptizität $[\theta]$ (Grad cm^2 $dmol^{-1}$) angegeben, definiert durch die Beziehung

$$[\theta] = \frac{100 \cdot \delta}{1 \cdot c} = \frac{100 \cdot \delta \cdot \epsilon}{1 \cdot A}$$

wobei für δ die gemessene Elliptizität in Grad, l die Schichtdicke in cm, A die Extinktion und ϵ der molare Extinktionskoeffizient eingesetzt wird.

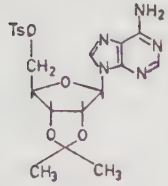
Infrarotspektroskopie (IR)
Festsubstanzen werden nach Trocknen im Vakuum über Phosphorpentoxid in KBr an einem Beckmann IR 18 A vermessen.

Protonenkernresonanzspektroskopie (PMR)
Alle Spektren werden an einem Varian XL 100 nach der Puls-Fourier-Transform-Methode aufgenommen. Die 20 millimolaren Lösungen in deuterierten Lösungsmitteln (D_2O, DMF-d_7, DMSO-d_6,

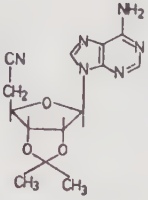
Methanol-d_4, $CDCl_3$; Merck Uvasole) machen bei 0,5 cm Röhrchendurchmesser 200-500 Pulse erforderlich. Als interner Standard dient Trimethylsilyl-d_4-propionat-Na-Salz. Sollen Proben zurückgewonnen werden, so werden alle Shifts auf einen Lösungsmittelpeak mit bekannter Verschiebung bezogen und auf einen internen Standard verzichtet.
Verwendete Abkürzungen: s - Singulett, d - Dublett, t - Triplett, m - Multiplett.

Massenspektrometrie (MS)
In Einzelfällen werden normale Massenspektren im Hochvakuum getrockneter Proben an einem Varian MAT 711 bzw. Varian CH 7 mit direktem Einlaßsystem aufgenommen. Weil viele Nucleoside hartnäckig Lösungsmittel festhalten, schwer flüchtig sind und fragmentreiche Massenspektren ergeben, werden Felddesorptionsmassenspektren bevorzugt (FD-MS), weil hier grob getrocknete Festsubstanzen oder Lösungen in einem beliebigen rückstandsfreien Lösungsmittel eingesetzt werden können. Aufgrund der schonenden Ionenerzeugung erhält man signalarme Spektren mit intensiven M^+-Peaks. Die sehr schwer verdampfenden Nucleosidcarbonsäure und -amide ergeben nach herkömmlicher Methode überhaupt keine brauchbaren Massenspektren mehr.

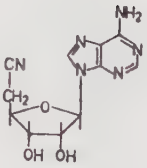
3.1.2. Darstellung einzelner Verbindungen



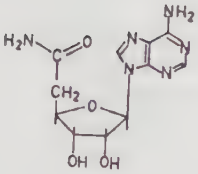
(1)



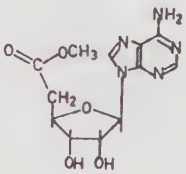
(2)



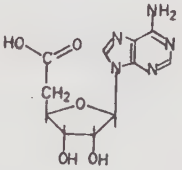
(3)



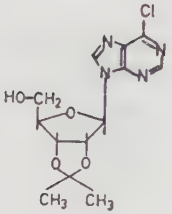
(4)



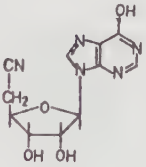
(5)



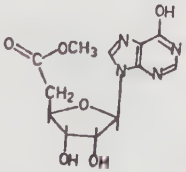
(6)



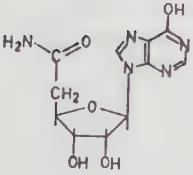
(7)



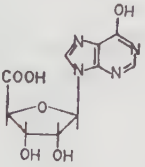
(8)



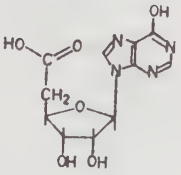
(9)



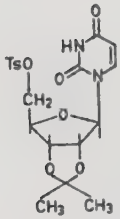
(10)



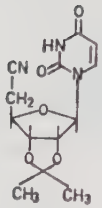
(11)



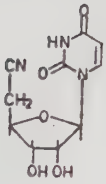
(12)



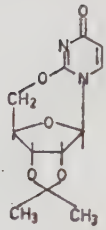
(13)



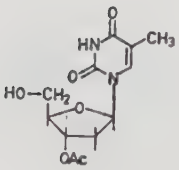
(14)



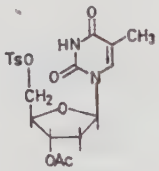
(15)



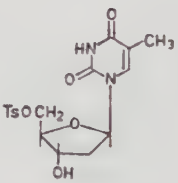
(16)



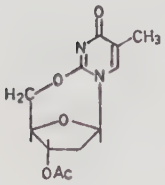
(17)



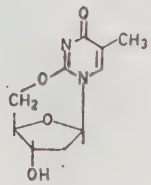
(18)



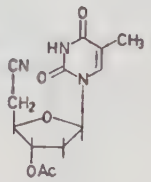
(19)



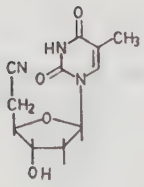
(20)



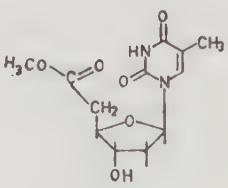
(21)



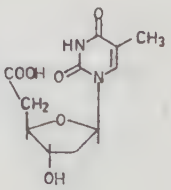
(22)



(23)



(24)



(25)

3.1.2.1. Adenosinderivate (1-6)

5'-Tosyl-2',3'-isopropylidenadenosin (1)

wird nach R. Kuhn und W. Jahn [36] aus 2',3'-Isopropylidenadenosin und p-Toluolsulfochlorid bei -20°C in wasserfreiem Pyridin erhalten. Für Nitrilsynthesen wird (1) erst aus Methanol, dann aus Essigester umkristallisiert.

F_p: 300°C

DC: Kieselgel 0,41 (A); 0,67 (B); 0,58 (D).

5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin (2)

Zu einer Lösung von 3,5 g (8 mMol) aus Essigester umkristallisiertem, getrocknetem 5'-Tosyl-2',3'-isopropylidenadenosin (1) und 0,5 g (2 mMol) 18-Krone-6 in 20 ml absolutem Dioxan werden 1,5 g (24 mMol) getrocknetes KCN gegeben. Die Suspension rührt man bei Raumtemperatur 20 Stunden und trennt dann von Feststoffen ab, die 3 mal mit je 3 ml absolutem Dioxan gewaschen werden. Die vereinigten Dioxanlösungen werden erneut mit 1,5 g KCN und 0,5 g 18-Krone-6 versetzt und weitere 20 Stunden gerührt. Die Prozedur widerholt man noch einmal und trennt nach 60 Stunden Gesamtreaktionsdauer Feststoffe ab und wäscht 3 mal mit Dioxan, vereinigt die Eluate und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und auf einer Kieselgelsäule mit Chloroform und steigendem Anteil Methanol (20:1 - 6:1) chromatografiert. Nach einer kleinen Menge (1) eluiert man 1,75 g (2) als Rohprodukt (68%), das durch präparative Schichtchromatografie auf Kieselgel oder Umkristallisieren aus Methanol weiter gereinigt werden kann.

F_p: 202 - 204°C

DC: Kieselgel: 0,33 (A); 0,59 (B); 0,54 (D)
Cellulose: 0,76 (A)

PC: 0,63 (A); 0,87 (B); 0,80 (C)

UV: λ_{max} (nm) 257 (pH = 1)
258/207 (pH = 7)
(pH = 12) s. 2.1.2.1.

CD: $[\theta]_{270} = -400$; $[\theta]_{225} = 3600$

FD-MS: $(M+2H)^+$ 318 (4,6%); $(M+H)^+$ 317 (24,6%); M^+ 316 (100%); $(M-CH_3)^+$ 301 (6,4%); $(M-Adenin)^+$ 182 (3,8%)

MS: M^+ 316 (3,4%); $(M-CH_3)^+$ 301 (8,4%); $(M-Aceton)^+$ 258 (9,1%); $(M-Aceton-CH_2CN)^+$ 218 (100%); $(M-Base)^+$ 182 (2,2%); $(Adenin+3O)^+$ 164 (36,3%); $(Adenin+H)^+$ 135 (33,8%); $(Adenin)^+$ 134 (4,2%)

IR: 2250 cm^{-1}: C≡N - Valenz

PMR: DMSO-d_6 (Methanol-d_4): H-8: 8,40 (8,24) s; H-2: 8,24 (8,24) s; H-1': 6,30 (6,22) d; H-2': 5,51 (5,49) m; H-3': 5,05 (5,07) m; H-4': 4,50 (4,446) m; H-5': 3,13 (3,01) d; $(CH_3)_a$: 1,60 (1,58) s; $(CH_3)_b$: 1,39 (1,37) s; NH_2: 7,46 s

5'-Desoxy-5'-cyanoadenosin (3)

1 g (2) wird in 20 ml Ameisensäure gelöst und mit 20 ml Wasser versetzt. Nach 6 Tagen bei Raumtemperatur ist die Abspaltung der Schutzgruppe vollständig. Die flüchtigen Bestandteile werden bei 35°C im Vakuum entfernt. Nach Gefriertrocknung läßt sich (3) aus Wasser umkristallisieren. Ausbeute 85%.

F_p: 175°C (Zersetzung)

DC: Kieselgel: 0,24 (D)
Cellulose: 0,35 (A)

PC: 0,14 (A); 0,53 (B); 0,63 (C)

UV: λ_{max} (nm) 257 (pH = 1)
258/207 (pH = 7)
(pH = 12) s. 2.1.2.1.

CD: $[\theta]_{265} = -700$; $[\theta]_{225} = 900$; $[\theta]_{195} = 2300$

FD-MS: M^+ 276 (100%)

MS: M^+ 276 (3,3%); $(M-CH_2CN)^+$ 236 (3,3%); $(Adenin+3O)^+$ 164 (41,5%); $(Adenin+2H)^+$ 136 (67,8%); $(Adenin+H)^+$ 135 (100%); $(Adenin)^+$ 134 (2,9%)

IR: 2250 cm^{-1}: C≡N - Valenz

PMR: D_2O: H-8: 8,29 s; H-2: 8,19 s; H-1': 6,07 d; H-2': 4,86 m; H-3', H-4': 4,74 - 4,68 m; H-5': 3,16 d

6'-Adenosincarbonsäureamid (4)

300 mg (3) und 50 mg $NaHCO_3$ werden in 10 ml Wasser gelöst. Mit 0,1 N NaOH stellt man exakt auf pH 10 ein und gibt 0,5 ml 30%iges Wasserstoffperoxid zu. Nach einer Stunde bei 40°C entfernt man alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum. Man löst den Rückstand in wenig verdünntem Ammoniak (pH nicht über 10) und trägt ihn auf eine Anionenaustauschersäule (Dowex 1x2, Formiatform) auf. Mit Wasser eluiert man (4), das nach Gefriertrocknen aus Wasser umgefällt werden kann (240 mg, 74%). Durch Anlegen eines pH-Gradienten von 5,0 - 2,5 (Ameisensäure) erhält man im schwach Sauren eine sehr geringe Menge Adenin, im stärker Sauren wenig Adenosincarbonsäure.

DC: Kieselgel: 0,04 (D)
Cellulose: 0,12 (A)

PC: 0,03 (A); 0,29 (B); 0,47 (C)

UV: λ_{max} (nm) 257 (pH = 1)
258 (pH = 7)
259 (pH = 12)

CD: $[\theta]_{265} = -1300$; $[\theta]_{225} = 3000$ (Schulter);
$[\theta]_{208} = 8400$

FD-MS: $(M+H)^+$ 295 (100%); M^+ 294 (33%)

PMR: DMSO-d_6 (D_2O): H-8: 8,37 (8,25) s; H-2: 8,20 (8,20) s; H-1': 5,89 (6,04) d; H-5': (2,82) m; C-6-NH_2: 7,40 s; C-6'-NH_2: 6,89 s

6'-Adenosincarbonsäuremethylester (5)

Man löst 1,3 g Rohprodukt (2) in 10 ml absolutem Methanol, das bei -10°C mit trockenem HCl gesättigt wurde und leitet dann noch 30 Minuten HCl bei unveränderter Temperatur durch die Lösung. Nach 15 Stunden bei -15°C entfernt man im Vakuum rasch alle flüchtigen Bestandteile; mit je 5 ml absolutem Methanol wird noch zweimal aufgenommen und abgedampft. Die Lösung des Rückstandes in 10 ml kaltem Methanol versetzt man mit 10 ml Eis-

wasser und bewahrt 4 Stunden bei 4°C auf. Man verdünnt mit Wasser auf 15 ml und filtriert über eine kurze Anionenaustauschersäule in der Formiatform (Dowex 1x2). Nacheinander wird mit je 20 ml Methanol, 50%igem wäßrigen Methanol und Wasser gewaschen. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum zur Trockne eingeengt und mit 50%igem Methanol aufgenommen. Die neutrale Lösung trägt man auf PSC-Kieselgelplatten (200x200x2 mm) auf und chromatografiert in D mindestens 3 mal. Elution der intensivsten Bande ($R_f \approx 0{,}60$) mit Methanol und Ausfällen aus methanolischer Lösung in der Kälte liefert 400-450 mg (5) (32-36%). Aus der nächstintensiven Bande ($R_f \approx 0{,}35$) kann 5'-Cyanoadenosin (3) unverändert zurückgewonnen werden.

DC: Kieselgel: 0,45 (D)
Cellulose: 0,46 (A)

UV: λ_{max} (nm) 257 (pH = 1)
258/207 (pH = 7)
259 (pH = 13)

CD: $[\theta]_{265} = -1200$; $[\theta]_{235} = 850$; $[\theta]_{215} = -1400$;
$[\theta]_{205} = 4100$

FD-MS: M^+ 309 (100%); $(M+H)^+$ 310 (79%); $(Adenin)^+$ 135 (34%)

IR: 1740 cm^{-1}: Ester-C=O - Valenz

PMR: D_2O: H-8: 8,27 s; H-2: 8,23 s; H-1': 6,05 d;
H-2', H-3', H-4': 4,85 - 4,15 m; H-5': 2,96 m;
O-CH_3: 3,70 s

6'-Adenosincarbonsäure (6)

410 mg (1,3 mMol) 6'-Adenosincarbonsäuremethylester (5) werden in 5 ml Methanol gelöst und mit 0,1 N NaOH versetzt. Nach 8 und 16 Stunden werden nochmals je 5 ml 0,1 N NaOH zugegeben; die Verseifung ist nach 25-30 Stunden vollständig und die alkalische Lösung wird direkt auf eine Dowex 1x2 -Säule (Formiatform) gegeben. Elution mit Ameisensäure steigender Konzentration (pH = 5,0 - 2,5) liefert in einheitlicher Fraktion 6'-Adenosincarbonsäure (6), die aus kleinem Volumen durch Ansäuern mit Ameisensäure ausfällt oder durch Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten wird (330 mg, 86%). Weniger reine

Fraktionen von (6) können durch Auflösen mit verdünntem Ammoniak und Wiederausfällen mit Ameisensäure problemlos gereinigt werden.

DC: Kieselgel: 0,0 (A)
Cellulose: 0,0 (D)

UV: λ_{max} (nm) 257 (pH = 1)
258 (pH = 7)
259 (pH = 13)

CD: pH = 2: $[\theta]_{250} = -1700$; $[\theta]_{225} = 3400$;
$[\theta]_{210} = -6200$; $[\theta]_{198} = 2800$;
pH = 7: $[\theta]_{260} = -2500$; $[\theta]_{215} = -1700$;
$[\theta]_{198} = 2600$;
pH = 12: $[\theta]_{265} = -2600$; $[\theta]_{220} = -1800$

FD-MS: M^+ 295 (5%); $(M+H)^+$ 296 (100%); $(Adenin)^+$ 135 (4%); $(M-CO_2)^+$ 251 (3,8%)

PMR: D_2O, pH = 7: H-8: 8,31 s; H-2: 8,19 s; H-1': 6,02 d; H-2': 4,72 m; H-3': 4,48 m; H-4': 4,26 m; H-5': 2,69 m

3.1.2.2. Inosin- und 6-Chlorpurinribosid-Derivate (7-12)

6-Chlor-2',3'-isopropylidenpurinribosid (7)

In Anlehnung an eine Vorschrift von A. Hampton[69] werden 1 g 6-Chlorpurinribosid (PWA) und 1,8 g Bis-(p-nitrophenyl)-phosphorsäure in einer Mischung aus 25 ml absolutem Aceton und 3 ml 2,2-Dimethoxypropan suspendiert. Nach 20 Minuten Rühren bei Raumtemperatur liegt eine gelbgrüne Lösung vor, die nach 2 Stunden Gesamtreaktionsdauer portionsweise in 30 ml 0,2 M $NaHCO_3$-Lösung gegossen wird. Einengen im Vakuum führt zu einem gelbgrünen Öl, in dem weißer Feststoff suspendiert ist. Durch mehrmaliges Behandeln mit siedendem Chloroform extrahiert man (7), das aus kleinem Volumen in der Kälte in farblosen Kristallen ausfällt (650 mg, ca. 50%)

DC: Kieselgel: 0,65 (D)

UV: λ_{max} (nm) 264 (pH = 6)

CD: $[\theta]_{272} = -2000$; $[\theta]_{220} = 3900$; $[\theta]_{210} = -1700$

FD-MS: M^+ 326/328

5'-Desoxy-5'-cyanoinosin (8)

20 mg (3) werden in 2 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 0,2 ml Eisessig, 0,1 ml 2 N HCl und 50 mg $NaNO_2$ läßt man 3 Tage bei Raumtemperatur stehen, filtriert dann durch wenig Dowex 1x2 (Formiatform) und wäscht mit 2 ml Wasser nach. Eluat und Waschflüssigkeit werden nach Entfernen aller flüchtigen Bestandteile mit wenig Wasser aufgenommen, neutralisiert und auf der Dünnschicht (Cellulose F, 200x200x0,2) in A chromatografiert (dreimaliges Entwickeln). Elution der intensivsten Bande ($R_f \approx 0,1$) mit Wasser ergibt reines (8). Nicht umgesetztes (3) kann aus der nächstintensiven Bande ($R_f \approx 0,25$) zurückgewonnen werden.

DC: Kieselgel: 0,11 (D)
Cellulose: 0,22 (A)

UV: λ_{max} (nm) 248 (pH = 1)
254 (pH = 7)

PMR: D_2O (DMSO-d_6): H-8: 8,29 (8,28) s; H-2: 8,22 (8,10) s; H-1': 6,11 (5,93) d; H-2' - H-4': 4,95 - 4,37 (4,67 - 4,15) m; H-5': 3,12 (3,08) m

6'-Inosincarbonsäuremethylester (9)

20 mg (5) werden in 2 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 0,2 ml Eisessig, 0,1 ml 2 N HCl und 50 mg $NaNO_2$ läßt man 2 Tage bei Raumtemperatur reagieren. Aufarbeitung erfolgt analog wie bei (8). Die intensivste Bande des DC-Chromatogramms ($R_f \approx 0,15$) enthält (9), die schwächere Bande ($R_f \approx 0,30$) nicht umgesetztes (5).

DC: Kieselgel: 0,18 (D)
Cellulose: 0,31 (A)

UV: λ_{max} (nm) 248 (pH = 1)
254 (pH = 7)
254 (pH = 12)

PMR: D_2O: H-8: 8,26 s; H-2: 8,21 s; H-1': 6,08 d; H-2'-H-4': 4,49 - 4,39 m; H-5': 2,96 m; $-OCH_3$: 3,69 s

6'-Inosincarbonsäureamid (10)

20 mg (4) werden, wie bei (8) beschrieben, umgesetzt und chromatografiert. Elution der unteren Hälfte der einzigen Bande (R_f = 0,05) mit Wasser ergibt (10), das noch eine Spur (4) enthält.

DC: Kieselgel: 0,02 (D)
Cellulose: 0,06 (A)

UV: λ_{max} (nm) 248 (pH = 1)
253 (pH = 7)
253 (pH = 13)

PMR: D_2O: H-8: 8,48 s; H-2: 8,27 s; H-1': 6,09 d; H-2'-H-4': 4,55 - 4,29 m; H-5': 2,84 m

5'-Inosincarbonsäure (11) und 6'-Inosincarbonsäure (12)

10 ml einer bei 40°C gesättigten Lösung von 5'-Adenosincarbonsäure bzw. 6'-Adenosincarbonsäure (6) in 10%iger Essigsäure läßt man nach Zugabe von 0,2 ml 2 N HCl und 200 mg $NaNO_2$ 3 Tage bei Raumtemperatur stehen. Nach Passage durch wenig Dowex 1x2 (Formiatform) engt man zur Trockne ein. Die schwach alkalisch gemachte Lösung des Rückstands wird auf eine Dowex 1x2 (Formiatform)-Säule (0,5x10 cm) aufgetragen. Nach Waschen mit Wasser eluiert man durch Anlegen eines Ameisensäuregradienten pH = 5,0 - 2,5 unveränderte Adenosincarbonsäure und Inosincarbonsäure nacheinander.

DC: Kieselgel: 0,0 (D)
Cellulose: 0,0 (A)

UV: λ_{max} (nm) 248 (pH = 1)
253 (pH = 7)
253 (pH = 13)

PMR (11): D_2O: H-8: 8,46 s; H-2: 8,16 s; H-1': 6,11 d; H-2', H-3': 4,78 $\pm$ 0,3 m; H-4': 4,45 m

3.1.2.3. Uridinderivate (13-16)

5'-Tosyl-2',3'-isopropylidenuridin (13)

wird analog zur Adenosinverbindung nach R. Kuhn und W. Jahn [36] aus 2',3'-Isopropylidenuridin dargestellt. Umkristallisieren aus Essigester erhöht die Löslichkeit in Dioxan bei der folgenden Nitrilsynthese.

DC: Kieselgel: 0,57 (D)

5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenuridin (14)

440 mg (13) und 130 mg 18-Krone-6 werden in 5 ml absolutem Dioxan gelöst und mit 350 mg trockenem KCN bei Raumtemperatur heftig gerührt. Nach 40 Stunden trennt man die Feststoffe ab und wäscht 3 mal mit 3 ml absolutem Dioxan. Beim Einengen erhält man ein gelbbraunes Öl, in dem weiße Festsubstanz suspendiert ist. Man extrahiert 3 mal mit 2 ml kaltem Essigester und chromatografiert den eingeengten Extrakt auf der Kieselgeldickschicht durch mehrmalige Läufe in D oder E. Elution der intensivsten Bande mit Essigester/Methanol 9:1 ergibt reines (14), das aus kleinem Volumen Lösungsmittel in der Kälte ausfällt. Der weiße Rückstand der Essigesterextraktion ist reines (16).

100 mg salzfreies, trockenes (16) und 50 mg 18-Krone-6 werden in 5 ml abs. Dioxan gelöst, mit 70 mg trockenem KCN versetzt und 2o Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann trennt man feste Bestandteile ab und reinigt den Überstand wie oben durch Kieselgeldickschichtchromatografie (Ausbeute um 45 %).

DC: Kieselgel: 0,48 (D)

UV: λ_{max} (nm) 264 (pH = 1)
258/205 (pH = 7)
(pH = 12) s. 2.1.2.1.

CD: $[\theta]_{262} = 4700$; $[\theta]_{230} = 1200$ (Schulter);
$[\theta]_{210} = -2100$

IR: 2240 cm^{-1}: C≡N - Valenz

PMR: DMSO-d_6: H-6: 7,71 d; H-4: 5,64 d; H-1': 5,81 d;
H-2': 5,16 m; H-3': 4,81 m; H-4': 4,75 m; H-5': 3,11 d;
$(CH_3)_a$: 1,54 s; $(CH_3)_b$: 1,53 s

5'-Desoxy-5'-cyanouridin (15)

10 mg (14) werden in 0,5 ml Ameisensäure gelöst und sofort mit 0,5 ml Wasser versetzt. Nach 7 Tagen bei Raumtemperatur wird alles Flüchtige im Vakuum entfernt; zurück bleibt reines (15), das aus Wasser oder Methanol ausfällt.

DC: Kieselgel: 0,11 (D)

UV: λ_{max} (nm) 264 (pH = 1)
260/205 (pH = 7)
(pH = 12) s. 2.1.2.1.

CD: $[\theta]_{269} = 6800$; $[\theta]_{238} = -2500$; $[\theta]_{216} = -3700$;
$[\theta]_{197} = 2800$

O^2,5'-Cyclo-2',3'-isopropylidenuridin (16)

440 mg (13) und 130 mg 18-Krone-6 werden in 10 ml absolutem Dioxan gelöst, mit 350 mg KCN versetzt und bei 30°C heftig gerührt. Nach 10 Stunden trennt man Feststoffe ab, engt den Überstand bis zur Trockne ein und extrahiert den braunen, öligen Rückstand, der weißen Feststoff enthält, 3 mal mit je 3 ml Essigester. Der weiße Rückstand ist die Hauptmenge (150 mg,55%) reines (16). Eine weitere Menge erhält man, wenn der Acetonextrakt des dioxanunlöslichen Reaktionsrückstands mit dem Essigesterextrakt vereinigt und über eine kurze Kieselgelsäule (1x1 cm) filtriert wird. Man wäscht mit dem dreifachen Volumen Aceton/abs. Methanol 6:1 nach, nimmt das Eluat in Essigester auf und bringt in der Kälte aus kleinem Volumen 40 mg (16) zum Ausfallen, das noch eine Spur Kaliumtosylat enthält.

DC: Kieselgel: 0,25 (D)

PC: 0,44 (A); 0,80 (B); 0,75 (C)

UV: λ_{max} (nm) 238 (pH = 7)

IR: 1620 cm^{-1}: C=O - Valenz; keine Lactam-N-H - Valenzschwingung mehr

PMR: DMSO-d_6: H-6: 8,04 d; H-5: 6,00 d; H-1': 5,88 s; H-2': 5,06 s; H-3': 5,06 s; H-4': 4,74 d; $(H\text{-}5')_a$: 4,63 m; $(H\text{-}5')_b$: 4,22 m; $(CH_3)_a$: 1,49 s; $(CH_3)_b$: 1,36 s

3.1.2.4. Thymidinverbindungen (17-25)

3'-O-Acetylthymidin (17)

Aus Thymidin wird durch Umsetzen mit Triphenylmethylchlorid erst das 5'-Triphenylmethylthymidin hergestellt, das durch Behandeln mit Essigsäurehydrid und anschließendes Abspalten der 5'-Triphenylmethylgruppe in (17) übergeht [129].

DC: Kieselgel: 0,43 (A), 0,50 (D)
Cellulose: 0,75 (A)

UV: λ_{max} (nm) 266 (pH = 1)
266/207 (pH = 7)
266 (pH = 13)

CD: $[\theta]_{274} = 3900$; $[\theta]_{242} = -2900$

IR: 3480 cm^{-1}: O-H - Valenz
1740 cm^{-1}: Ester-C=O - Valenz

5'-Tosyl-3'-O-acetylthymidin (18)

wird analog zu (1) und (13) aus 3'-O-Acetylthymidin (17) durch Umsetzen mit p-Toluolsulfochlorid in abs. Pyridin erhalten.

DC: Kieselgel: 0,49 (A), 0,67 (D)
Cellulose: 0,92 (A)

UV: λ_{max} (nm) 266/224 (pH = 1)
266/224 (pH = 7)
266/224 (pH = 13)

IR: 1740 cm^{-1}: Ester-C=O - Valenz; Fehlen einer O-H - Valenzschwingung

PMR: DMSO-d_6: H-6: 7,44 d; H-1': 6,15 t; H-2': 2,30 m; H-3': 5,12 m; H-4': 4,15 m; H-5': 4,30 m; C-5-CH_3: 1,79 d; Acetyl-CH_3: 2,05 s; p-Tosyl-CH_3: 2,43 s; Aromaten-CH: 7,60 (AB-System)

5'-Tosylthymidin (19)

Eine Lösung von 0,87 g (2 mMol) (18) in 20 ml abs. Methanol wird mit dem gleichen Volumen abs. Methanol versetzt, das bei -10°C mit Ammoniak gesättigt wurde [74]. Nach 16 Stunden Aufbewahren im Gefrierfach wird Flüchtiges im Vakuum entfernt und der Rückstand 3 mal mit kaltem Wasser extrahiert. Zurück bleibt reines (19) (0,67 g, 85%).

DC: Kieselgel: 0,37 (D)
Cellulose: 0,88 (A)

UV: λ_{max} (nm) 265/224 (pH = 1)
265/224 (pH = 7)
265/224 (pH = 13)

PMR: DMSO-d_6: H-6: 7,40 d; 5-CH_3: 1,79 d; H-1': 6,17 m; H-2': 2,14 m; H-3': 3,90 m; H-4', H-5': 4,24 m; CH_3(Tosyl-): 2,44 s; Aromaten-H: 7,65 (AB-System)

O^2,5'-Cyclo-3'-O-acetylthymidin (20)

Zur Lösung von 0,9 g (18) und 0,3 g 18-Krone-6 in 20 ml abs. Dioxan gibt man 0,5 g trockenes KCN und erhitzt zum Rückfluß. Nach 45 Minuten läßt man abkühlen und rührt noch eine Stunde bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand (A) 3 mal mit je 10 ml Aceton extrahiert. Der Rückstand der Acetonlösung (B) wird einmal mit 5 ml Aceton behandelt; der Überstand enthält neben geringen Mengen (18) und (22) überwiegend Kaliumtosylat und wird verworfen. Durch Extraktion des Rückstands (B) mit siedendem Chloroform erhält man eine braune Lösung. Die nach Einengen ausfallende braune Festsubstanz wird verworfen, die farblose Chloroformlösung bis zur Trockne eingeengt. Man nimmt in wenig heißem Chloroform auf und trennt in der Kälte ausfallendes reines (20) ab. Extraktion des Rückstandes (A) mit siedendem Chloroform und analoge Aufarbeitung führt zur Hauptmenge (20), die noch Spuren Kaliumtosylat enthält (Gesamtausbeute 0,28 g, 53%).

DC: Kieselgel: 0,25 (D)

UV: λ_{max} (nm) 248 (pH = 7)

CD: $[\theta]_{235} = -22500$; $[\theta]_{195} = 59000$

IR: 1650 cm^{-1}: C=O - Valenz; 1730 cm^{-1}: C=O - Valenzschwingung von Essigsäureestern; Fehlen der Lactam-N-H-Bande

PMR: DMSO-d_6: H-6: 7,86 d; 5-CH_3: 1,85 d; H-1': 6,11 m; H-2': 2,65 m; H-3': 5,44 m; H-4': 4,67 s; H-5': 4,10 - 4,55 m; Acetyl-CH_3: 2,11 s

O^2,5'-Cyclothymidin (21)

100 mg (19) werden in 5 ml siedendem Dioxan gelöst. Nach Zugabe von 30 mg 18-Krone-6 und 50 mg KCN hält man noch 30 Minuten bei Rückfluß und entfernt dann das Lösungsmittel im Vakuum. Den Rückstand nimmt man in wenig abs. Methanol auf, filtriert durch wenig Dowex 1x2 (Formiatform, mit abs. Methanol äquilibriert) und engt sofort ein. Aus dem Essigesterextrakt dieses Rückstands fallen 20 mg (21) aus.

DC: Kieselgel: 0,06 (D)

UV: λ_{max} (nm) 248 (pH = 7)

IR: 1650 cm^{-1}: C=O - Valenz

FD-MS: M^+ 224 (100%)

PMR: DMSO-d_6: H-6: 7,78 d; 5-CH_3: 1,78 d; H-1': 5,98 m; H-2': 2,4 m; H-3': 5,23 m; H-4': 4,34 m; H-5': 4,95 - 4,55 m; 3'-O-H: 3,51 s

O^2,5'-Cyclo-3'-O-acetylthymidin (20) und O^2,5'-Cyclothymidin (21)

In Anlehnung an R. Letters und A.M. Michelson [73] werden zu 50 mg (18) in 5 ml abs. Dioxan 0,3 ml 1 M Kaliumtertiärbutylat in t-Butanol gegeben. Nach 30 Minuten bei 50°C chromatografiert man den Überstand per Kieselgeldünnschicht durch mehrmalige Läufe in D. Von 12 unterscheidbaren Banden enthalten die beiden intensivsten (20) ($R_f \approx 0,7$) und (21) ($R_f \approx 0,14$). Die Verbindungen sind nach allen spektroskopischen Kriterien mit den oben beschriebenen identisch.

5'-Desoxy-5'-cyano-3'-O-acetylthymidin (22)

Zu einer Lösung von 450 mg getrocknetem (18) in 20 ml abs. Dioxan gibt man 600 mg getrocknetes KCN und 150 mg 18-Krone-6. Nach 2 Tagen Rühren bei Raumtemperatur trennt man feste Reaktionsprodukte ab und chromatografiert den Überstand per PSC auf Kieselgel in D. Nach dreimaligem Entwickeln eluiert man die intensivste Bande mit abs. Methanol, woraus nach Einengen (22) in der Kälte auskristallisiert (140 mg, 45%).

DC: Kieselgel: 0,53 (D)
Cellulose: 0,77 (A)

UV: λ_{max} (nm) 265 (pH = 1)
265/206 (pH = 7)
(pH = 13) s. 2.1.2.1.

CD: $\left[\theta\right]_{\substack{275 \\ 194}}$ = 2050; $\left[\theta\right]_{245}$ = -2450; $\left[\theta\right]_{215}$ = -2750; $\left[\theta\right]_{194}$ = 4800

FD-MS: M^+ 394

IR: 2240 cm^{-1}: C N - Valenz; 1750 cm^{-1}: Ester-C=O - Absorption; Fehlen der O-H - Valenzschwingung

PMR: DMSO-d_6: H-6: 7,60 d; H-1': 6,24 t; H-2': 2,39 m; H-3': 5,18 m; H-4': 4,23 m; H-5': 3,11 d; C-5-CH_3: 1,85 d; Acetyl-CH_3: 2,12 s

5'-Desoxy-5'-cyanothymidin (23)

100 mg (22) löst man in 10 ml abs. Methanol, kühlt ab auf 0°C und versetzt mit 0,5 ml mit trocknem HCl gesättigtem abs. Methanol. Nach 12 Stunden im Eisbad entfernt man rasch alles Flüchtige und nimmt in wenig 50%igem, wäßrigem Methanol auf. Nach Passage über eine Dowex 1x2 (Formiatform) -Säule und Einengen des Eluats fällt aus methanolischer Lösung reines (23) aus (65 mg, 75%).

DC: Kieselgel: 0,40 (A), 0,19 (D)
Cellulose: 0,62 (A)

UV: λ_{max} (nm) 266 (pH = 1)
265/205 (pH = 7)
(pH = 13) s. 2.1.2.1.

CD: $\left[\theta\right]_{\substack{280 \\ 195}}$ = 500; 3400 $\left[\theta\right]_{250}$ = -2000; $\left[\theta\right]_{213}$ = -1600;

FD-MS: M^+ 251

IR: 2240 cm^{-1}: C≡N - Valenz; 3350 cm^{-1}: O-H - Valenz;
1690 cm^{-1}: C=O - Absorption

PMR: D_2O ($DMF-d_7$): H-6: 7,45 (7,63) d; H-1': 6,28 (6,36) t; H-2': 2,48 (2,36) m; H-3': 4,48 (4,06) m; H-4': 4,18 (4,44) m; H-5': 3,02 (3,09) m; C-5-CH_3: 1,91 (1,83) d

6'-Thymidincarbonsäuremethylester (24)

Zu 5 ml abs. Methanol, das bei -10°C mit trockenem HCl-Gas gesättigt wurde, gibt man eine Suspension von (22) in wenig kaltem Methanol. Man leitet noch weitere 20 Minuten HCl ein und bewahrt dann 4 Stunden bei -20°C auf. Bei 30°C Badtemperatur wird rasch alles Flüchtige im Vakuum entfernt; anschließend folgt zweimaliges Aufnehmen in Methanol und Einengen. Die Lösung des Rückstands in 50%igem Methanol läßt man eine kurze Säule mit Dowex 1x2 (Formiatform) passieren; nachgewaschen wird mit 3 mal 10 ml 50%igem Methanol. Die vereinigten Eluate werden eingeengt und mit PSC an Kieselgel (20x20x0,2 cm, 2x entwickeln) in D chromatografiert. Elution der intensivsten Bande mit Methanol ergibt reines (24). Aus der nächst intensivsten Bande gewinnt man nicht umgesetztes Nitril (23) als ungeschütztes Nucleosid.

DC: Kieselgel: 0,40 (D)
Cellulose: 0,72 (A)

UV: λ_{max} (nm) 265 (pH = 1)
266/205 (pH = 7)
267 (pH = 13)

CD: $\left[\theta\right]_{275}$ = 2800; $\left[\theta\right]_{243}$ = -1200; $\left[\theta\right]_{215}$ = -2800;
$\left[\theta\right]_{195}$ = 10300

FD-MS: M^+ 284 (100%); $(M+H)^+$ 285 (23%); $(M-Thymin)^+$ 159 (3%)

IR: 1740 cm^{-1}: Ester+C=O - Valenz

PMR: DMF-d_7 ($CDCl_3$): H-6: 7,58 (7,15) m; 5-CH_3: 1,84 (1,94) m; H-1': 6,30 (6,19) t; H-2': 2,30 (2,35) m; H-3', H-4': 4,26 (4,16; 4,39) m; H-5': 2,82 (2,80) m; -OCH_3: 3,66 (3,74) s

6'-Thymidincarbonsäure (25)

10 mg (24) löst man in 2 ml 50%igem wäßrigen Methanol und macht mit 0,2 ml 2 N NaOH alkalisch. Nach 12 Stunden bei Raumtemperatur gibt man 0,5 ml Ameisensäure zu und engt ein. In der Kälte fällt (25) teilweise aus; man gewinnt aus dem Überstand durch Ionenaustauschchromatografie analog wie bei (6) beschrieben, eine weitere Fraktion (25); Gesamtausbeute > 85%.

DC: Kieselgel: 0,0 (D)
Cellulose: 0,0 (A)

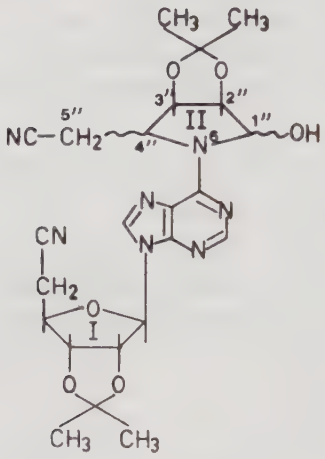
UV: λ_{max} (nm) 265 (pH = 1)
265/207 (pH = 7)
265 (pH = 13)

CD: pH = 2,0 ± 0,5:
$\left[\theta\right]_{273}$ = 3400; $\left[\theta\right]_{243}$ = -900; $\left[\theta\right]_{230}$ = 500;
$\left[\theta\right]_{220}$ = -500;

pH = 7,0 ± 0,5:
$\left[\theta\right]_{270}$ = 5700; $\left[\theta\right]_{237}$ = -1400; $\left[\theta\right]_{215}$ = -900;
$\left[\theta\right]_{200}$ = 4100;

pH = 12,0 ± 0,5:
$\left[\theta\right]_{267}$ = 5800; $\left[\theta\right]_{231}$ = -3650; $\left[\theta\right]_{215}$ = -5250

3.1.3. Selbstkondensation von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin (2)



200 mg (2) werden unter Erwärmen in 2 ml abs. Aceton gelöst. Zur abgekühlten Lösung gibt man 20 µl 50% KOH und rührt 24 Stunden bei Raumtemperatur. Dann wird ausgefallenes Adenin abgetrennt; den Überstand chromatografiert man auf der Kieselgeldickschicht in D. Elution der intensiven Bande $R_f \approx 0{,}8$ mit Chloroform/Methanol 1:1 ergibt nach Entfernen des Lösungsmittels einen farblosen, aufgeblähten Rückstand mit der in 2.1.2.2. beschriebenen Struktur.

DC: Kieselgel: 0,8 (D)

UV: λ_{max} (nm) 266 (pH = 1)
264/208 (pH = 7)
272 (pH = 12)

FD-MS: M^+ 497 (100%) s. Abb.

PMR: s. Abb. 16

3.2. Enzymkinetik

3.2.1. Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten

3.2.1.1. AMP-Desaminase (E.C. 3.5.4.6)

$$AMP \longrightarrow IMP + NH_3$$

Die Aktivität von AMP-Desaminase aus Kaninchenmuskel (Sigma, Grade IV) wird bei 25°C in 50 mM MES-TRIS-Puffer (pH 6,0 oder 6,5) bzw. in 50 mM HEPES-TRIS-Puffer (pH 7,0 oder pH 7,5) , jeweils 0,2 M KCl durch Verfolgung der Extinktionsabnahme bei 265 nm an einem Zeiss PMQ 3 mit gekoppeltem Schreiber kinetisch gemessen. Die Substrate werden in Konzentrationen zwischen 50 µM und 1 mM vorgelegt; die Maximalkonzentrationen erfordern Quarzküvetten von 1 mm Schichtdicke. Sämtliche Stammlösungen der Substrate bzw. potentiellen Substrate (Adenosincarbonsäuren) sind mit festem TRIS auf den pH des Testpuffers zu bringen. Gestartet wird durch Zugabe der Desaminase: Experimente mit 6'-Adenosincarbonsäure als Substrat verlangen unverdünnte Enzymlösungen (15 µg Protein pro Test); für alle anderen Substrate wird die Originalenzymlösung mit kalter 1 M KCl verdünnt. Die erwünschten Desaminierungsgeschwindigkeiten von 7'-Didehydroadenosincarbonsäure erreicht man mit 2 µg Protein pro Test (Zugabe einer 1:8 mit 1 M KCl verdünnten Originalenzymlösung). Bei Verwendung von 5'-AMP und 7'-Adenosincarbonsäure als Substrate wird eine AMP-Desaminase-Stammlösung mit 60 µg Protein pro ml bereitgestellt, die für Experimente mit der 7'-Säure unverdünnt verwendet wird (resultierende Testkonzentration: 0,1 µg Protein / ml). Kurz vor jeweils 6 Messungen mit 5'-AMP als Substrat wird eine weiter verdünnte Enzym-Stammlösung frisch hergestellt, sodaß die Endkonzentration an Desaminase im Test 0,03 µg pro ml beträgt. Höhere Enzymkonzentrationen wären aus den in 2.2.1.2. dargelegten Gründen zwar wünschenswert, sind aber meßtechnisch nicht zu bewältigen. Die kinetischen Parameter sind doppelt-reziproken Auftragungen (Lineweaver-Burk-Plots) entnommen.

3.2.1.2. Adenosindesaminase (E.C. 3.5.4.4)

$$\text{Adenosin} \longrightarrow \text{Inosin} + NH_3$$

Adenosindesaminase aus Kälberdarm (Boehringer Mannheim, 2 mg Protein pro ml) wird unter den Testbedingungen der 5'-Nucleotidase (s. unten) in o,1 M TRIS - Cl - Puffer, pH 8,5 studiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,01 µg (Inhibierungstests) bzw. 0,2 µg (Tests auf Substrateigenschaft) Desaminase pro Test gestartet und bei 265 nm und 25 °C an einem Zeiss PMQ 3 mit angeschlossenem Schreiber verfolgt. Als Substrate werden 5'-, 6'- und 7'-Adenosincarbonsäure sowie 6'-Adenosincarbonsäurenitril, -Ester und -Amid in Konzentrationen zwischen 50 und 250 µM angeboten. Auf inhibierende Wirkung prüft man alle Adenosincarbonsäuren im Konzentrationsbereich 100 - 300 µM bei gleichbleibend 50 µM Adenosin im Test.

3.2.1.3. 5'-Nucleotidase (E.C. 3.1.3.5)

$$\text{5'-AMP} \longrightarrow P_i + \text{Adenosin}$$

$$\text{Adenosin} \longrightarrow \text{Inosin} + NH_3$$

5'-Nucleotidase aus Schlangengift (Crotalus atrox; Sigma, Grade V) wird mit 5'-AMP als Substrat bei 25°C in einem gekoppelten Test mit Adenosindesaminase aus Kälberdarm (s.o.) über die Extinktionsabnahme bei 265 nm in Quarzküvetten mit 1 cm, 0,5 cm und 0,1 cm Schichtdicke an einem Zeiss PMQ 3 mit Schreiber vermessen. In 0,1 M TRIS-Cl-Puffer, pH 8,5 und 0,1 M MES-TRIS-Puffer, pH 6,5 wird zur K_M-Wert-Bestimmung die AMP-Konzentration zwischen 25 und 250 µM variiert; bei jeweils festen Substratkonzentrationen 25, 33, 50 und 100 µM AMP bestimmt man die Anfangsgeschwindigkeiten in Gegenwart von 50, 100, 150, 200, 250 und 350 µM Inhibitor (5'-,6'-, 7'-Adenosincarbonsäure). Die Adenosindesaminasekonzentration im Test be-

trägt einheitlich 0,2 µg Protein pro ml. Die als Lyophilisat gelieferte Nucleotidase wird in Testpuffer (TRIS-Cl pH 8,5) aufgenommen und soweit verdünnt, daß davon 20 µl pro Test (1ml / 1cm -Küvette) mit 50 µM AMP eine Extinktionsänderung von 0,01 pro Minute bewirken. Da die Aktivität in ungewöhnlicher Weise vom Alter der Nucleotidaselösung abhängt, werden im Verlauf der Meßzeit stündlich drei Kontrollen mit einer AMP-Konzentration von 50 µM durchgeführt. Man erhält so ein zeitabhängiges Aktivitätsprofil, dessen Abweichungen von einem willkürlich angenommenen Mittelwert die Berechnung eines Korrekturfaktors erlauben, mit dem Anfangsgeschwindigkeiten innerhalb einer Meßserie vergleichbar gemacht werden. Die Daten werden in doppelt reziproker Auftragung (Lineweaver - Burk), in direkt linearer Auftragung (Eisenthal, Cornish-Bowden) oder nach Dixon-Webb (1/V gegen Inhibitorkonzentration) veranschaulicht; kinetische Parameter können allen Darstellungen entnommen werden.

3.2.1.4. Myokinase (ATP:AMP-Phosphotransferase, E.C.2.7.4.3)

$$\text{AMP} + \text{ATP} \rightleftharpoons 2\ \text{ADP}$$
$$\text{ADP} + \text{PEP} \longrightarrow \text{Pyruvat} + \text{ATP}$$
$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} \rightleftharpoons \text{Lactat} + \text{NAD}$$

Myokinase aus Kaninchen- und Schweinemuskel (Boehringer Mannheim, jeweils 2 mg Protein pro ml) wird bei 25°C über die ATP-regenerierende / Pyruvat-freisetzende Pyruvatkinasereaktion mit der NADH-verbrauchenden Lactatdehydrogenasereaktion gekoppelt und bestimmt. Man mißt die Extinktionsabnahme bei 340 nm an einem Zeiss PMQ 3 mit angeschlossenem Schreiber. In TRIS-Cl-Puffer pH 7,6; 0,1 M KCl; 1 mM $MgSO_4$ betragen die Testkonzentrationen von ATP 0,6 mM, von NADH 0,4 mM, von Phosphoenolpyruvat (PEP) 0,4 mM und an Lactatdehydrogenase / Pyruvatkinasemischung (Boehringer Mannheim, 1:1-Mischung in Bezug auf Aktivitäten) 40 µg pro ml; die AMP-Konzentration wird zwischen 0,05 und 20 mM variiert. Die Stammlösungen von AMP, ATP, PEP und aller Adenosincarbonsäuren werden mit festem Tris auf pH 7,6

eingestellt. Man startet durch Zugabe von jeweils 0,1 µg Myokinase. Die Inhibierungsstudien werden jeweils bei fixen AMP-Konzentrationen (45, 60, 75 und 120 µM) in Gegenwart von 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 und 3,5 mM 5'-, 6'-, 7'-Didehydro- und 7'-Adenosincarbonsäure durchgeführt. Die Auswertung der Anfangsgeschwindigkeiten erfolgt wie bei der Nucleotidase durch Dixon- oder Lineweaver-Burk-Auftragungen. Wo in den Experimanten mit Adenosincarbonsäuren Hemmung beobachtet wird, kontrolliert man den aus Dixon-Plots abgeleiteten Hemmungstyp durch Erstellung der direkt-linearen Diagramme nach Eisenthal / Cornish-Bowden.

3.2.2. Diagramme

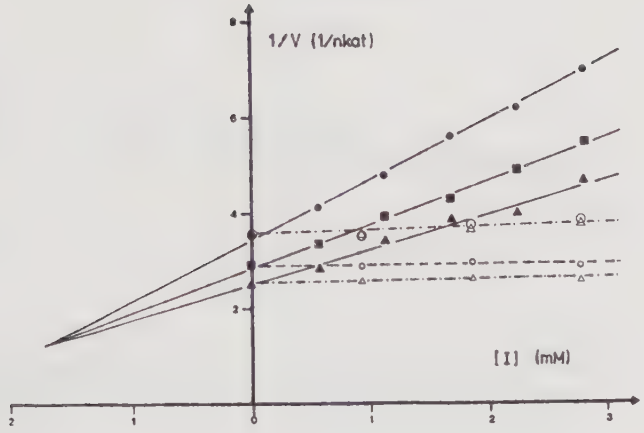


Abb. 45 : Dixon-Plot der Inhibierung von Myokinase (Kaninchen) durch 7'-Adenosincarbonsäure (——) in Gegenwart von 45 µM (●), 58 µM (■) und 76 µM (▲) AMP; keine Inhibierung duch 5'-Adenosincarbonsäure (—·—) und 6'-Adenosincarbonsäure (— —)

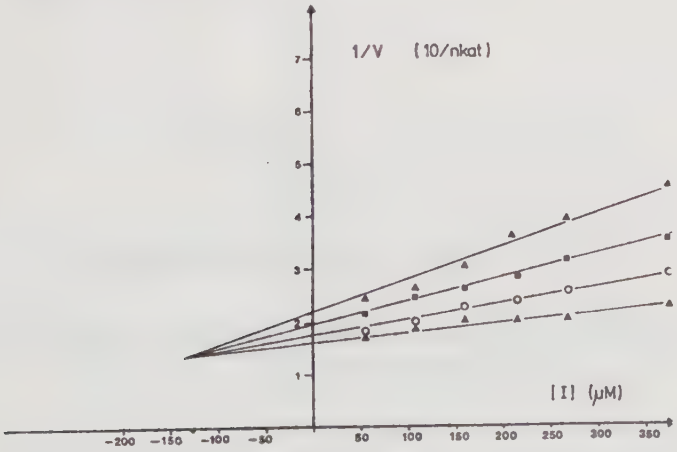


Abb. 46 : Dixon-Plot der Inhibierung von 5'-Nucleotidase durch 5'-Nucleosidcarbonsäure bei pH 6,5 ; s. Legende Abb.47

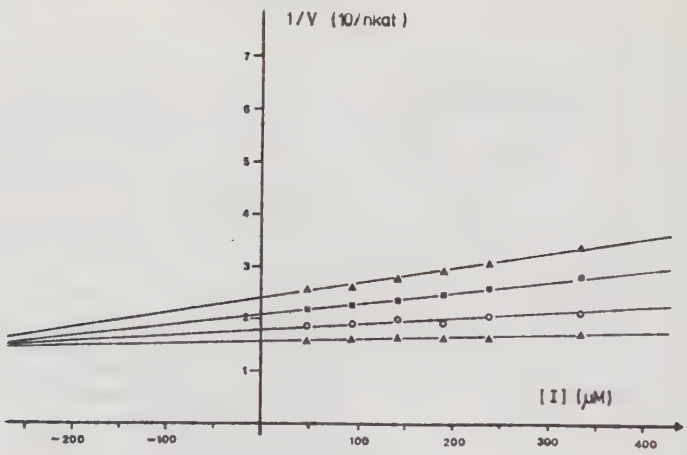


Abb. 47 : Dixon-Plot der Inhibierung von 5'-Nucleotidase durch 5'-Adenosincarbonsäure bei pH 8,5 in Gegenwart von 25 µM (Δ), 33 µM (■), 50 µM (o) und 100 µM (▲) AMP.

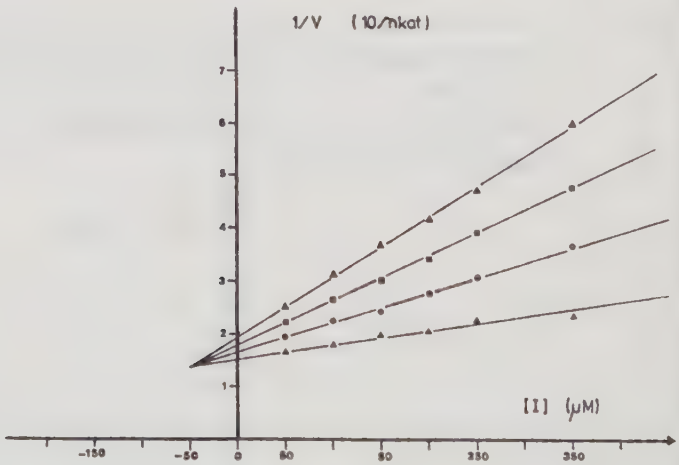


Abb. 48 : Dixon-Plot der Inhibierung von 5'-Nucleotidase durch 6'-Adenosincarbonsäure bei pH 6,5; 25 µM (Δ), 33 µM (■), 50 µM (o) und 100 µM (▲) AMP.

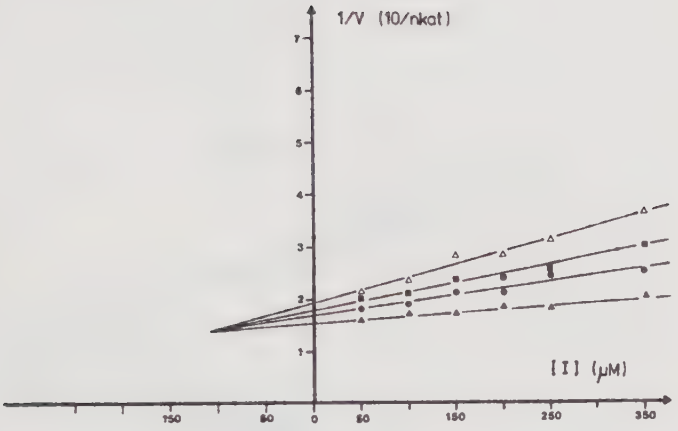


Abb. 49 : Dixon-Plot der Inhibierung von 5'-Nucleotidase durch 7'-Adenosincarbonsäure bei pH 6,5; 25 µM (△), 33 µM (■), 50 µM (○) und 100 µM (▲) AMP.

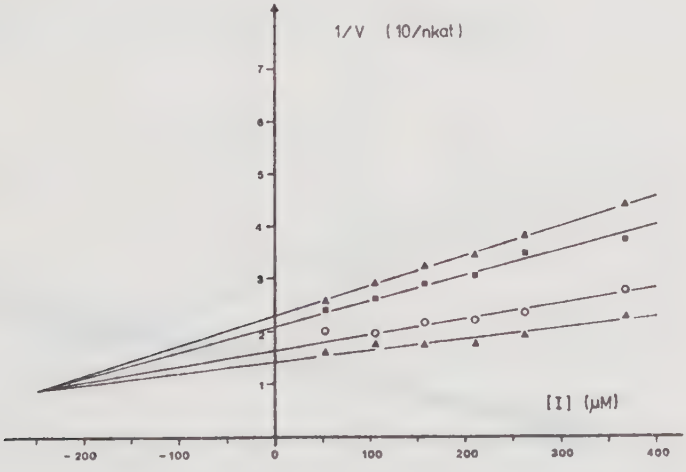


Abb. 50 : Dixon-Plot der Inhibierung von 5'-Nucleotidase durch 7'-Adenosincarbonsäure bei pH 8,5; 25 µM (△), 33 µM (■), 50 µM (○) und 100 µM (▲) AMP.

Abb. 51 - 55 : Lineweaver-Burk-Diagramme der Hydrolyse von 5'-AMP durch 5'-Nucleotidase in Gegenwart von Adenosincarbonsäuren (50 μM (□), 100 μM (△), 150 μM (●), 200 μM (■), 250 μM (o) und 350 μM (▲))

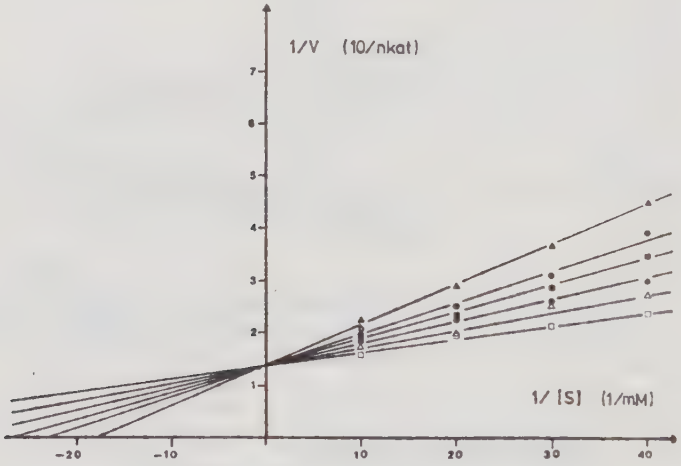


Abb. 51 : 5'-Adenosincarbonsäure als Inhibitor (pH 6,5)

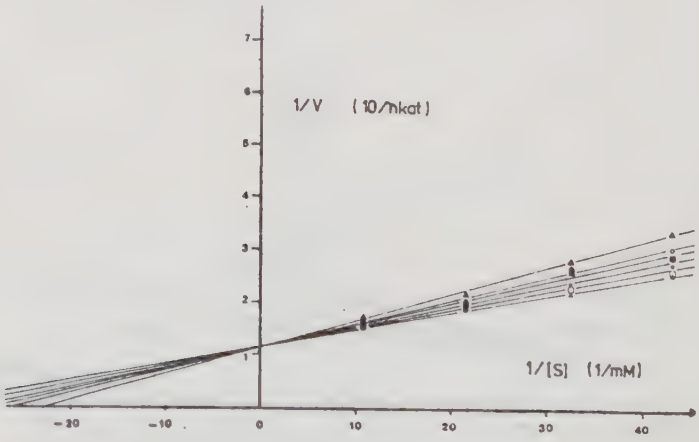


Abb. 52 : 5'-Adenosincarbonsäure als Inhibitor (pH 8,5)

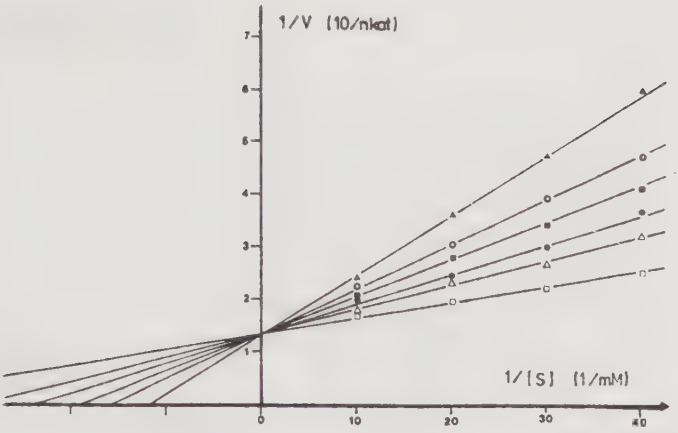


Abb. 53 : 6'-Adenosincarbonsäure als Inhibitor (pH 8,5)

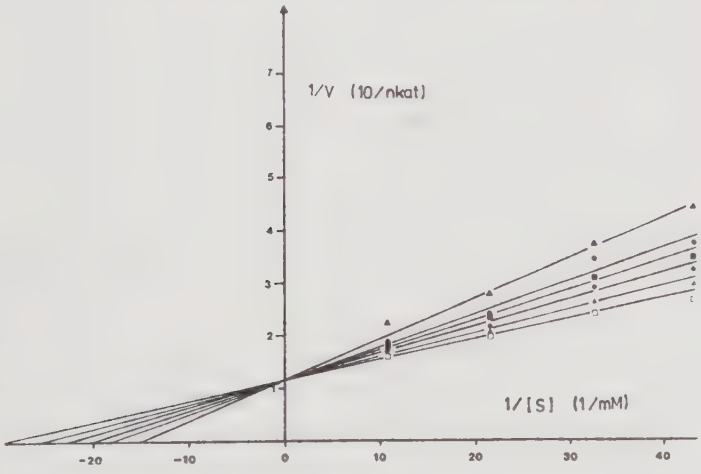


Abb. 54 : 7'-Adenosincarbonsäure als Inhibitor (pH 6,5)

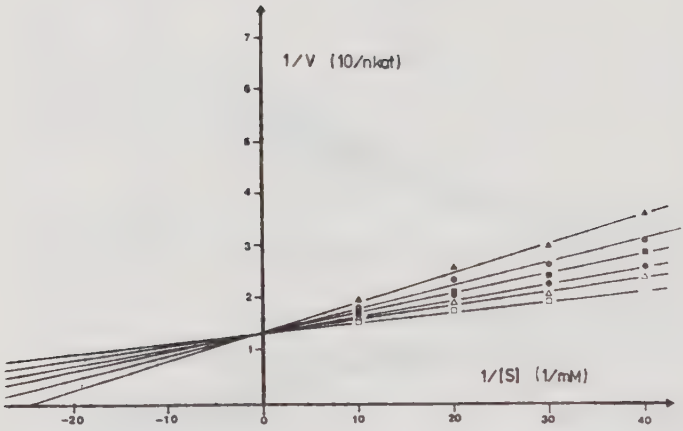


Abb. 55 : 7'-Adenosincarbonsäure als Inhibitor (pH 8,5)

4. Zusammenfassung

Zum Studium der spezifischen Funktion der Zucker- und Phosphatkomponenten in Nucleotiden sind nur wenige Strukturvariationen in Modellverbindungen denkbar. Unter ihnen kommt homologen Nucleosid-5'-carbonsäuren besondere Bedeutung zu. Sie gleichen den Nucleotiden bei physiologischen pH-Werten im anionischen Charakter, können aber als Monoanion nur in einer geladenen Spezies vorliegen. Nucleotidumsetzende Enzyme akzeptieren Nucleosidcarbonsäuren, die geeignete Moleküldimensionen aufweisen, als Substrat oder in einer regulatorischen Funktion. Bisher fehlten aus dieser Verbindungsklasse die formal von Hexofuranosen abgeleiteten 6'-Nucleosidcarbonsäuren, die auch per se Interesse als potentielle Pharmaka beanspruchen. Zusammen mit den schon bekannten 5'-Nucleosidcarbonsäuren (Uronsäuren) und den in Einzelexemplaren beschriebenen 7'-Nucleosidcarbonsäuren (Heptofuranose-Derivaten) erlauben es solche Verbindungen, biophysikalische und biochemische Fragestellungen über die Wechselbeziehung zwischen Struktur, Konformation und Funktion von Nucleotiden in Enzymsystemen zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wird ein präparativ anwendbarer und offenbar allgemeiner Reaktionsweg vorgestellt, der mit kronenetheraktiviertem Cyanid die Synthese neuer 5'-Desoxy-5'-cyanoribo- und-Desoxyribonucleoside (= 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrile) gestattet. Aus den 5'-Tosylaten von 2',3'-Isopropylidenadenosin und -Uridin sowie aus 5'-Tosyl-3'-O-acetylthymidin wurden mit 18-Krone-6 / KCN Nitrile erhalten; setzte man 5'-Tosyluridin und -Thymidin im selben System bei erhöhter Temperatur um, so entstanden als Hauptprodukte die O^2,5'-Cyclo-(Anhydro-)pyrimidinnucleoside, die bisher nur unter wesentlich umständlicheren Bedingungen zugänglich waren. Die O^2,5'-Cyclonucleoside wurden erneut den Nitrilsynthesebedingungen unterworfen und reagierten unter O^2,5'-Bindungstrennung ebenfalls zu den lange gesuchten 5'-Cyanopyrimidinnucleosiden.

Gemeinsam ist allen dargestellten 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrilen die Labilität der N-Glykosidbindung in wässrig-alkalischer

Lösung; die Abstraktion eines Protons von der acidifizierten 5'-Methylengruppe hat Ringöffnung der Furanose und Eliminierung der Nucleobase zur Folge. Durch spektroskopische Verfolgung der Spaltung und Identifizierung der abgespaltenen Nucleobase wurde der Mechanismus der für Nucleoside außergewöhnlichen Reaktion sichergestellt. Einen weiteren Beweis lieferte die Reaktion von 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosin in Aceton mit KOH; es ensteht nicht das zu erwartende Kondensationsprodukt der Methylengruppe mit Aceton, sondern unversehrtes Ausgangsnucleosid reagiert am N^6 mit dem Spaltungsprodukt 5-Cyano-2,3-dihydroxy-(2,3-O-isopropyliden)-pent-4-enal zu einem C-6-Pyrollidinderivat des 5'-Desoxy-5'-cyano-2',3'-isopropylidenadenosins. Nur bei exakter Kontrolle von Temperatur und pH können daher 6'-Nucleosidcarbonsäurenitrile mit H_2O_2 bei pH 10 ohne Nucleosidspaltung zum Amid eumgesetzt werden; so wurde 6'-Adenosincarbonsäureamid in guten Ausbeuten erhalten.

Eine präparativ brauchbare Synthese der gesuchten 6'-Nucleosidcarbonsäuren aus den entsprechenden Nitrilen ist nur in wasserfreier, saurer Lösung erfolgreich und führt über das Iminoesterhydrochlorid und den Ester. Dank der bisher kaum beachteten Stabilität selbst von Desoxynucleosiden in wasserfreiem Alkohol / HCl gelingt die Darstellung der leicht verseifbaren Methylester von 6'-Adenosin- und Thymidincarbonsäure. Aus allen dargestellten Adenosinderivaten wurden die entsprechenden Inosinderivate in bekannter Weise durch Desaminierung am C-6 erhalten.

Die CD-Spektren aller verfügbaren Nucleosidcarbonsäuren und -Carbonsäurederivate belegen die generell gültige anti-Konformation von Base und Zucker in Lösung; die vielfältigen Parallelen in CD-Spektren entsprechender Nucleosidcarbonsäurederivate der Adenosin-, Uridin- und Thymidinreihe zeigen, daß der Wechselwirkung zwischen 5'-Substituent und Nucleobase ein einheitlicher Mechanismus zugrunde liegt, der letztlich für die Äquivalenz von Purin- und Pyrimidinbausteinen in Nucleinsäuren verantwortlich ist.

Als Beispiele für die Aktivität von Nucleosidcarbonsäuren in Enzymsystemen erweisen sich die AMP-analogen 6'- und 7'-Adenosincarbonsäuren als Substrate des 5'-AMP-spezifischen Enzyms AMP-Desaminase (E.C. 3.5.4.6) aus Kaninchenmuskel. 7'-Adenosincarbonsäure wird mit einer der natürlichen Substrat 5'-AMP (V = 100 %) nahekommenden Maximalgeschwindigkeit (21 %) zum Inosinderivat umgesetzt; 7'-Dehydro- (3,5 %) und 6'-Adenosincarbonsäure (0,6 %) sind ebenfalls Substrate. Wie ein Vergleich der kinetischen Parameter bei verschiedenen pH-Werten zeigt, variieren die Maximalgeschwindigkeiten mit der Kettenlänge des anionischen 5'-Substituenten, während die Substratbindung (K_M-Wert) von der konformativen Flexibilität der Adenosincarbonsäuren abhängt. Für die Inaktivität der Adenosinuronsäure machen wir primär die starre Molekülkonformation (H-Brücke zwischen H-8 und Carboxylat) verantwortlich. Für eine Substrateigenschaft ist ein Monoanion im richtigen Abstand zu Ribofuranosering und Adeninbase bei passender anti-Konformation erforderlich.

Adenosincarbonsäuren sind ferner kompetitive Inhibitoren der AMP-umsetzenden Enzyme Myokinase (ATP:AMP-Phosphotransferase, E.C.2.7.4.3) und 5'-Nucleotidase (E.C. 3.1.3.5); ihre Hemmung hängt von der 5'-C-Kettenlänge ab. Myokinase zeigt eine enge Toleranz für passende Kettenlänge des anionischen 5'-Substituenten: 5'- und 6'-Adenosincarbonsäure sind inaktiv, allein die 7'-Adenosincarbonsäuren inhibieren. Wegen der zahlreichen Einstellungsmöglichkeiten der Carboxylatgruppe hemmt 7'-Adenosincarbonsäure effektiver ($K_I \approx 7\ K_M$) als 7'-Dehydroadenosincarbonsäure ($K_I \approx 15\ K_M$). Myokinase aus Kaninchen- und Schweinemuskel unterscheiden sich bezüglich der Adenosincarbonsäuren weder in der Abstufung, im Ausmaß noch im Typ der Hemmung voneinander. 5'-Nucleotidase aus Schlangengift wird am stärksten von 6'-Adenosincarbonsäure gehemmt (6'-Säure $\gg$ 7'-Säure $\approx$ 5'-Säure). Da 5'- und 7'-Säure vergleichbar inhibieren, liegt ein aktives Zentrum anderer räumlicher Beschaffenheit und geringerer Substratspezifität vor als bei AMP-Desaminase oder Myokinase.

5. Literatur

1. T.-Y. Feng, J. Tu, T.-T. Kuo, Eur. J. Biochem. 87, 29 (1978)
2. Y. Taya, Y. Tanaka, S. Nishimura, Nature 271, 545 (1978)
3. D. E. Atkinson, Biochemistry 7, 4030 (1968)
4. A. G. Chapman, D. E. Atkinson, J. Biol. Chem. 248, 8309 (1973)
5. V. L. Schramm, H. Leung, J. Biol. Chem. 248, 8313 (1973)
6. C. L. Zielke, C. H. Suelter, in The Enzymes IV, 47 (1971)
7. V. L. Schramm, J. Biol. Chem. 249, 1729 (1974)
8. V. L. Schramm, J. Biol. Chem. 251, 3417 (1976)
9. G. I. Drummond, M. Yamamoto, in Boyer (Ed.), The Enzymes, Vol. IV, 337 (1971)
10. G. A. Tejwani, A. Ramaiah, Biochem. J. 125, 507 (1971)
11. M. D. Edge, A. Hodgson, A. S. Jones, M. MacCoss, R. T. Walker, J. Chem. Soc. 290 (1972)
12. A. S. Jones, M. MacCoss, R. T. Walker, Biochim. Biophys. Acta, 294, 365 (1973)
13. M. D. Edge, A. Hodgson, A. S. Jones, R. T. Walker, J. Chem. Soc. 1991 (1972)
14. M. Halford, A. S. Jones, J. Chem. Soc. (C) 2668 (1968)
15. A. Hodgson, S. S. Jones, Tetrahedron Letters 52, 5349 (1972)
16. T. E. Walker, H. Follmann, H. P. C. Hogenkamp, Carbohydr. Res. 27, 225 (1973)
17. H. Follmann, Angew. Chem. 86, 41 (1974)
18. W. Meyer, Diplomarbeit, Marburg 1975
19. P. J. Harper, A. Hampton, J. Org. Chem. 35, 1688 (1970)
20. G. P. Moss, C. B. Reese, K. Schofield, R. Shapiro, A. Todd, J. Chem. Soc. 1149 (1963)
21. A. Hampton, P. J. Harper, Arch. Biochem. Biophys. 143, 340 (1971)
22. D. Sück, W. Saenger, W. Rohde, Biochim. Biophys. Acta, 361, 1 (1974)
23. J. J. Baker, P. Mellish, C. Riddle, A. R. Sommerville, J. R. Tittensor, J. Med. Chem. 17, 764 (1974)
24. A. Hampton, R. R. Chawla, J. Carbohydrates Nucleosides Nucleotides 2, 281 (1975)

25. A. Hampton, P. Howgate, F. Perini, F. Kappler, R. K. Preston, Biochemistry, 12, 3328 (1973)
26. I. Merits, Xenobiotica, 3, 541 (1973)
27. W. Schütz, G. Raberger, Arch. int. Pharmacodyn. 219, 140 (1976)
28. H. H. Stein, P. Somani, Ann. N.Y. Acad. Sci. 255, 380 (1975)
29. K. Turnheim, B. Plank, N. Kolassa, Biochem. Pharmac. 27, 2191 (1978)
30. R. R. Schmidt, H.-J. Fritz, Chem. Ber. 103, 1867 (1970)
31. H.-J. Fritz, R. Machat, R. R. Schmidt, Chem. Ber. 105, 642 (1972)
32. K. E. Pfitzner, J. G. Moffatt, J. Amer. Chem. Soc. 87, 5561 (1965)
33. E. Böhnke, Diplomarbeit, Marburg 1973
34. J. J. Baker, A. M. Mian, J. R. Tittensor, Tetrahedron 30, 2939 (1974)
35. W. Jahn, Chem. Ber. 98, 1705 (1965)
36. R. Kuhn, W. Jahn, Chem. Ber. 98, 1699 (1965)
37. J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt, J. Org. Chem. 35, 2319 (1970)
38. W. Meyer, E. Böhnke, H. Follmann, Angew. Chem. 88, 512 (1976)
39. G. Etzold, G. Kowollik, P. Langen, Chem. Comm. 422 (1968)
40. D. M. Brown, A. R. Todd, S. Varadarajan, J. Chem. Soc. 868 (1957)
41. A. M. Michelson, The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, S. 15 , London 1963
42. H. Venner, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 339, 14 (1964)
43. R. Shapiro, M. Danzig, Biochemistry, 11, 23 (1972)
44. P. Howgate, A. S. Jones, J. R. Tittensor, Carbohydr. Res. 12, 403 (1970)
45. H. Follmann, I. Kuntz, W. Zacharias, Eur. J. Biochem. 58, 31 (1975)
46. J. Baddiley, W . Frank, N. A. Hughes, J. Wieczorkowski, J. Chem. Soc. 1999 (1962)
47. E. V. Dehmlow, Angew. Chem. 86, 187 (1974)
48. E. V. Dehmlow, Angew. Chem. 88, 521 (1977)

49. C. J. Pedersen, H. K. Frensdorff, Angew. Chem. 84, 16 (1972)
50. J. Dockx, Synthesis 8, 441 (1973)
51. J. W. Zubrick, B. I. Dunbar, H. Dupon Durst, Tetrahedron Letters 71 (1975)
52. F. L. Cook, Chauncey W. Bowers, C. L. Liotta, J. Org. Chem. 39, 3416 (1974)
53. H. Follmann, Tetrahedron Letters, 397 (1973)
54. M. J. Robins, J. R. McCarthy Jr., R. K. Robins, J. Heterocyc. Chem. 4, 313 (1967)
55. J. Žemlička, R. Gasser, J. V. Freisler, J. P. Horwitz, J. Amer. Chem. Soc. 94, 3213 (1972)
56. J. P. Horwitz, J. Chua, in W. W. Zorbach, R. S. Tipson, in Synthetic Proceduresin Nucleic Acid Chemistry, New York 1968
57. J. Sicher, Angew. Chem. 84, 177 (1972)
58. R. Mengel, W. Guschlbauer, Angew. Chem. 90, 557 (1978)
59. B. Radziszewski, Ber. 18, 355 (1885)
60. H. L. Vaughn, M. D. Robbins, J. Org. Chem. 40, 1187 (1975)
61. M. J. Cook, E. J. Forbes, G. M. Khan, Chem. Commun. (5) 121 (1966)
62. G. V. Kryshtal, L. A. Yanovskaya, V. F. Kucherov, Tetrahedron 29, 2053 (1973)
63. R. Parthasarathy, M. Soriano-Garcia, Nature, 260, 807 (1976)
64. R. Parthasarathy, J. M. Ohrt, G. B. Chheda, Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 211 (1974)
65. T. P. Pitner, J. D. Glickson, Biochemistry, 14, 3083 (1975)
66. H. Henecka, P. Kurtz, in Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Bd. VIII, 697 , Stuttgart, 1952
67. G. A. Olah, J. A. Olah, J. Org. Chem. 30, 2386 (1965)
68. A. M. Michelson, The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, S. 54, 55, 82, 83, London 1963
69. A. Hampton, J. Chem. Soc. 83, 3640 (1961)
70. H. Follmann, G. Gremels, Eur. J. Biochem. 47, 187 (1974)

71. H. Follmann, R. Pfeil, H. Witzel, Eur. J. Biochem. 77, 451 (1877)
72. G. Gremels, Diplomarbeit, Marburg 1972
73. R. Letters, A. M. Michelson, J. Chem. Soc. 1410 (1961)
74. A. M. Michelson, A. R. Todd, J. Chem. Soc. 816 (1955)
75. D. W. Miles, M. J. Robins, R. K. Robins, M. W. Winkley, H. Eyring, J. Amer. Chem. Soc. 91, 824 (1969)
76. W. H. Inskeep, D.W. Miles, H. Eyring, J. Amer. Chem. Soc. 92, 3866 (1970)
77. D. W. Miles, W. H. Inskeep, M. J. Robins, M. W. Winkley, R. K. Robins, H. Eyring, J. Amer. Chem. Soc. 92, 3873 (1970)
78. M. Ikehara, S. Uesugi, K. Yoshida, Biochemistry 11, 836 (1972)
79. F. W. Lichtenthaler, H. J. Müller, Angew. Chem. 85, 765 (1973)
80. F. W. Lichtenthaler, H. J. Müller, Synthesis (3) 199 (1974)
81. G. T. Rogers, T. L. V. Ulbricht, FEBS-Lett. 7, 337 (1970)
82. U. Niedballa, H. Vorbrüggen, J. Org. Chem. 39, 3660 (1974)
83. W. Ludwig, H. Follmann, Eur. J. Biochem. 82, 393 (1978)
84. C. L. Zielke, C. H. Suelter, in The Enzymes (Boyer, Ed.) Vol. IV, 47 (1971)
85. C. Solano, C. J. Coffee, Biochem. Biophys. Res. Comm. 85, 564 (1978)
86. C. J. Coffee, W. A. Kofke, J. Biol. Chem. 250, 6653 (1975)
87. N. Ogasawara, H. Goto, Y. Yamada, M. Yoshino, Biochem. Biophys. Res. Comm. 79, 671 (1977)
88. A. Raggi, C. Bergamini, G. Ronca, FEBS- Lett. 58, 19 (1975)
89. N. Ogasawara, H. Goto, T. Watanabe, Biochim. Biophys. Acta, 403, 530 (1975)
90. B. Setlow, J. M. Lowenstein 242, 607 (1967)
91. K. L. Smiley, A. J. Berry, C. H. Suelter, Biol. Chem. 242, 2502 (1967)
92. B. Setlow, J. M. Lowenstein, J. Biol. Chem. 243, 3409 (1968)

93. B. Setlow, R. Burger, J. M. Lowenstein, J. Biol. Chem. 241, 1244 (1966)
94. K. Tornheim, J. M. Lowenstein, J. Biol. Chem. 250, 6304 (1975)
95. K. Tornheim, J. M. Lowenstein, J. Biol. Chem. 249, 3241 (1974)
96. W. N. Fishbein, V. W. Arbrustmacher, J. L. Griffin, Science 200, 545 (1978)
97. B. Ashby, C. Frieden, J. Biol. Chem. 252, 1869 (1976)
98. K. L. Smiley, C. H. Suelter, J. Biol. Chem. 242, 1980 (1967)
99. A. Raggi, M. Ranieri, G. Taponeco, S. Ronca-Testoni, G. Ronca, C. A. Rossi,FEBS-Lett. 10, 101 (1970)
100. C. L. Zielke, C. H. Suelter, J. Biol. Chem. 246, 2179 (1971)
101. A. Boosman, O. P. Chilson, J. Biol. Chem. 251, 1847 (1976)
102. D. O'Driscoll, N. P. Roring, C. A. Ross, Biochem. Soc. Trans. Vol. 4, 928 (1976)
103. B. Evans, R. Wolfenden, J. Amer. Chem. Soc. 92, 4751 (1970)
104. R. Wolfenden, Biochemistry, 8, 2409 (1969)
105. R. Wolfenden, T. K. Sharpless, R. Allan, J. Biol. Chem. 242, 977 (1967)
106. P. M. Murphy, M. Noonan, P. Collins, E. Tolly, T. G. Brady, Biochim. Biophys. Acta 171, 157 (1969)
107. M. F. Dunn, Structure and Bonding, 23, 61 (1975)
108. A. Hampton, P. Howgate, F. Perini, F. Kappler, R. K. Preston, Biochemistry, 12, 3328 (1973)
109. A. Hampton, F. Perini, P. J. Harper, Biochmistry 12, 1730 (1973)
110. A. Hampton, P. J. Harper, T. Sasaki, P. Howgate, R. K. Preston, Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 945 (1975)
111. R. M. Hemphill, C. L. Zielke, C. H. Suelter, J. Biol. Chem. 246, 7237 (1971)
112. B. Ashby, C. Frieden, J. Biol. Chem. 253, 8728 (1978)
113. J. C. W. Campbell, C. H. Suelter, Biochemistry 16, 4836 (1977)

114. H. Follmann, in Nuclear Magenetic Resonanz Spectroscopy in Molecular Biology (B. Pullman, Ed.), 323 (1978)
115. L. Noda, in The Enzymes (Boyer, Ed.) Vol. VIII, 279 (1973)
116. W. J. O'Sullivan, L. Noda, J. Biol. Chem. 243, 1424 (1968)
117. S. Su, P. J. Russel, Biochim. Biophys. Acta 132, 370 (1967)
118. M. Cohn, J. S. Leigh Jr., G. H. Reed, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 533 (1972)
119. J. A. Secrist, J. R. Barrio, N. J. Leonard, G. Weber, Biochemistry 11, 3499 (1972)
120. D. G. Rhoads, J. M. Lowenstein, J. Biol. Chem. 243, 3963 (1968)
121. D. L. Purich, H. J. Fromm, Biochim. Biophys. Acta 268, 1 (1972)
122. A. Cornish-Bowden, Biochem. J. 137, 143 (1974)
123. R. Eisenthal, A. Cornish-Bowden, Biochem. J. 139, 715 (1974)
124. A. Cornish-Bowden, R. Eisenthal, Biochem. J. 139, 721 (1974)
125. A. Hampton, P. J. Harper, T. Sasaki, Biochemistry 11, 4965 (1972)
126. A. Hampton, T. Sasaki, B. Paul, J. Amer. Chem. Soc. 95 4404 (1973)
127. E. Sulkowski, W. Björk, M. Laskowski, J. Biol. Chem. 238, 2477 (1963)
128. F. Schneider, Naturwissenschaften, 65, 376 (1978)
129. J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt, in W. W. Zorbach, R. S. Tipson (Eds.) Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry, 386 , New York (1968)

Lebenslauf

16. September 1949	Geburt als Sohn des Chemie-Ingenieurs Hermann Meyer und seiner Frau Käthe geborene Pickel
1955 - 1959	Besuch der Volksschule in Pommelsbrunn
1959/60	Besuch der Volksschule in Hersbruck, Landkreis Nürnberger Land
1960	Eintritt in den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums Hersbruck
28. Juni 1969	Abitur
Oktober 1969	Aufnahme des Chemiestudiums an der Philipps-Universität Marburg
Oktober 1971	Diplomvorprüfung
Juli 1974	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
1974 - 1975	Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. H. Follmann in der Abteilung Biochemie des Fachbereichs Chemie
14. November 1975	Abschluß als Diplomchemiker
Dezember 1975 - Dezember 1978	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Follmann

Herrn Prof. Dr. H. Follmann gilt mein besonderer Dank für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und sein persönliches Engagement.

Herrn Mbonimana und Herrn Wittkamp danke ich für die Aufnahme zahlreicher NMR- und Massenspektren

Herrn Prof. Dr. G.Ebert, Fachbereich Physikalische Chemie, danke ich für die Bereitstellung des Spektralpolarimeters.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes danke ich für gewährte Stipendien und Beihilfen.